

**„Funktionelle Charakterisierung von T-Helferzell-
Subpopulationen bei der Antigen-
induzierten Arthritis“**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dipl.-Biochemiker René Eilenstein

geboren am 20. März 1975 in Cottbus

März, 2010

Gutachter

1. PROF. DR. ROLF BRÄUER

INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT, JENA

2. PROF. DR. REINHARD WETZKER

INSTITUT FÜR MOLEKULARE ZELLBIOLOGIE, FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT, JENA

3. PROF. DR. DR. JÖRG KRIEGSMANN

ZENTRUM FÜR HISTOLOGIE; ZYTOLOGIE UND MOLEKULARE DIAGNOSTIK; TRIER

Tag der öffentlichen Verteidigung: 21.06.2010

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	II
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1 Die Rheumatoide Arthritis (RA)	3
2.2 Experimentelle Arthritismodelle	7
2.2.1 Übersicht	7
2.2.2 Das Modell der Antigen-induzierten Arthritis	8
2.3 Bedeutung verschiedener Th-Subpopulationen in der RA	9
2.3.1 Th1/Th2-Zellen	9
2.3.2 Th17-Zellen	11
2.3.2.1 Th17-Differenzierung bei der Maus	11
2.3.2.2 Th17-Differenzierung beim Menschen	13
2.3.3 Treg-Zellen	14
2.3.3.1 nTreg- und iTreg-Zellen	16
2.4 Die Bedeutung von CD4⁺ Th-Zellen und ihrer Zytokine in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen	17
2.5 Zielstellung der Dissertation	20
3. MATERIAL UND METHODEN	22
3.1 Material	22
3.1.1 Geräte	22
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	22
3.1.3 Kit-Systeme	23
3.1.4 Chemikalien & Reagenzien	23
3.1.5 Kulturmedium und Puffer	24
3.1.6 Versuchstiere	26
3.1.6.1 Züchtung der IL-17-/INF- γ -defizienten Maus	27
3.1.6.2 Biopsieentnahme und Isolierung genomischer DNA	27
3.2 Methoden	28
3.2.1 Immunisierung und Arthritisinduktion	28
3.2.2 Behandlung der Versuchstiere mit verschiedenen Antikörpern	29
3.2.3 Klinische Parameter der AIA	30
3.2.4 Histologie	31
3.2.5 Bestimmung matrixspezifischer Antikörper	32

3.2.6 Bestimmung der Zytokine sowie der Proliferationsrate	33
3.2.7 Isolierung von Zellen über Microbeads	35
3.2.8 Separation von Lymphozyten aus Augenblut	36
3.2.9 Fibroblastenaktivierung mit ex vivo stimulierten Milzzellen	37
3.2.10 Zymographie	39
3.2.11 MMP-Aktivitäts-Assay	40
3.2.12 Isolierung von RNA	41
3.2.13 Biochemische und immunbiochemische Protein-Nachweismethoden	44
3.2.14 FACS	46
3.2.15 Statistische Auswertung	47
4. ERGEBNISSE	48
4.1 Untersuchungen der AIA in IFN-γ-defizienten und anti-IFN-γ-AK-behandelten Mäusen	48
4.1.1 Klinische Parameter der AIA	48
4.1.2 Histologische Bewertung	49
4.1.3 Immunologische Parameter der AIA	49
4.1.3.1 Zytokinbestimmung in Zellkulturüberständen	49
4.1.3.2 Proliferationsassay	50
4.1.3.3 mRNA-Expressionsanalysen von LK-Zellgemischen	51
4.1.3.4 mRNA-Expressionsanalysen im Augenblut	52
4.1.3.5 Charakterisierung von Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie	53
4.2 Der Einfluss der Depletion CD4⁺ Zellen auf die AIA in IFN-γ^{-/-} Mäusen	55
4.2.1 Klinische und histologische Parameter	55
4.2.2 Immunologische Parameter der AIA	55
4.2.2.1 Durchflusszytometrische Beurteilung der CD4-Depletion	55
4.2.2.2 Zytokinbestimmung in Zellkulturüberständen	56
4.2.2.3 Proliferationsassay	57
4.3 Die AIA bei Defizienz des proinflammatorischen Zytokins IL-17	57
4.3.1 Klinischer Verlauf und histologische Bewertung der AIA bei IL-17-defizienten Tieren	57
4.3.2 Immunologische Parameter der AIA	58
4.3.2.1 Proliferationsassay	58
4.3.2.2 mRNA-Expressionsanalysen und Zytokinbestimmung von LK-Zellen	59
4.3.2.3 Charakterisierung von Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie	60

4.3.2.4 Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 bei IL-17-Defizienz	60
4.4 Vergleich der AIA in IL-17-defizienten und Wildtyp-Tieren nach Depletion regulatorischer T-Zellen	61
4.4.1 Depletion CD25 ⁺ Zellen in WT-Tieren	62
4.4.1.1 Klinische und histologische Parameter	62
4.4.1.2 Proliferationsrate und mRNA-Expressionsprofil von Milzzellen CD25-depletierter Tiere	63
4.4.2 Der Einfluss CD25 ⁺ Zellen auf in vitro generierter Th17-Zellen	63
4.4.3 Die Depletion CD25 ⁺ Zellen in IL-17-defizienten Mäusen	64
4.4.3.1 Klinische und histologische Parameter	64
4.4.3.2 Zytokin-Expressionsprofil von Milzen und Bestimmung matrixspezifischer AK im Serum	65
4.5 Die Depletion CD4⁺ Zellen in IL-17-defizienten Mäusen	67
4.5.1 Klinische und histologische Parameter	67
4.5.2 Immunologische Parameter der AIA	67
4.5.2.1 Proliferationsassay	67
4.6 Der Einfluss von IFN-γ auf die AIA in IL-17-defizienten Mäusen	68
4.6.1 Klinischer Verlauf der AIA und Konzentration matrixspezifischer AK im Serum	68
4.6.2 Immunologische Parameter der AIA	69
4.6.2.1 Proliferation und Zytokinbestimmung in Zellkulturüberständen	69
4.6.2.2 Th-Zell-spezifische Eigenschaften der IL-17-/IFN- γ -defizienten Maus	70
4.7 Modulation der Synoviozytenaktivität bei sich veränderten Zytokinmuster	72
4.7.1 Die Rolle von IFN- γ und IL-17 bei der Aktivierung synovialer Fibroblasten	72
4.7.1.1 Bestimmung der MMP-Gesamtaktivität	72
4.7.1.2 Bestimmung der Aktivität von MMP-3 und MMP-9	73
4.7.1.3 Zymographischer Nachweis der MMP-9-Aktivität	74
4.7.1.4 TIMP- und MMP-Expressions (Transkriptions) profile	75
4.7.1.5 Bestimmung von Zytokinen in Kokulturüberständen	75
4.7.2 Die Aktivierung synovialer Fibroblasten bei fehlender IL-17-/IFN- γ -Stimulation	76
4.7.2.1 Bestimmung der MMP-Gesamtaktivität	76
4.7.2.2 Zymographischer Nachweis der MMP-9-Aktivität in Überständen synovialer Fibroblasten	78
4.7.2.3 TIMP- und MMP-Expressions (Transkriptions) profile	78
4.7.2.4 Bestimmung ausgewählter Zytokine in Kokulturüberständen	79

5. DISKUSSION	80
5.1 Th1- und Th17-Zellen bei der AIA	81
5.2 Regulatorische T-Zellen	86
5.3 Interaktionen von IL-17 und IFN- γ	88
5.4 Einfluss von IFN- γ und IL-17 auf synoviale Fibroblasten	91
6. LITERATURVERZEICHNIS	97
7. ANHANG	114
Wissenschaftliche Beiträge	114
Danksagung	115
Lebenslauf	116
Ehrenwörtliche Erklärung	118

Abkürzungsverzeichnis

AIA	Antigen-induzierte Arthritis
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
BSA	Bovines Serum-Albumin
cDNA	Complementary DNA
CDS	Credit Default Swaps
CFA	Complete Freund's adjuvant
CIA	Collagen-induced arthritis
DNA	Desoxyribonuclein acid
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunoabsorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FLS	Fibroblasten-like synoviocytes
FoxP3	Forkhead box protein 3
FPLC	Fast protein liquid chromatography
GATA3	GATA binding protein3
HLA	Human leukocyte antigen
IFN- γ	Interferon γ
IFN- $\gamma^{-/-}$	Interferon- γ -knock out
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
iTreg	induzierte regulatorische Th-Zellen
i.v.	intravenös
KI	Kollagen Typ I
KII	Kollagen Typ II
kDa	Kilodalton
mBSA	methyliertes bovines Serum-Albumin
MHC	Major histocompatibility complex

MMP	Matrixmetalloproteasen
mRNA	messenger RNA
nTreg	natürliche regulatorische T-Zellen
OPD	Ortho-Phenylendiamin
OPG	Osteoprotegerin
PBS	phosphate-buffered saline (<i>Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung</i>)
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorophyll A protein
PG	Proteoglykane
PGIA	Proteoglykan-induzierte Arthritis
PO	Peroxidase
pH	pondus hydrogeni
RA	Rheumatoide Arthritis
RANKL	receptor activator of NF- κ B Ligand
RNA	Ribonuclein acid
ROR γ t	Retinoic acid-related orphan
rpm	round per minute (<i>Umdrehungen pro Minute</i>)
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time PCR
SCID	Severe combined immunodeficiency
SEM	Standard error of mean
SDS	Sodium dodecylsulfate
STAT	Signal transducer and activator of transcription
T-bet	T-box expressed in T cells
TGF- β	Transforming growth factor- β
Th	T-Helfer-Zellen
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Treg	regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zell-Rezeptor
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

1. Zusammenfassung

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische Erkrankung, die sowohl in der initialen Phase als auch während ihrer Progression, häufig in Form wiederkehrender Entzündungsschübe, durch unkontrollierte Reaktionen des Immunsystems auf Autoantigene gekennzeichnet ist. Hierbei können autoreaktive T-Zellen in direkter oder indirekter Art und Weise für die Homöostase der Gelenkintegrität essentielle Zellen wie Synoviozyten zur Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren sowie Knorpelmatrix-degradierender Enzyme stimulieren. Dies führt letztendlich zu pathologischen Veränderungen betroffener Gelenke.

Für die Analyse und das Verständnis der zugrunde liegenden komplexen Prozesse wurde der Verlauf der RA im Modell der murinen Antigen-induzierten Arthritis (AIA) simuliert. Hierfür wurde durch intraartikuläre Applikation eines xenogenen Antigens eine Entzündungsreaktion in vorimmunisierten Tieren induziert, die über die Ausbildung eines stark proliferierenden Granulationsgewebes (Pannus) eine fortschreitende, histologisch nachweisbare Destruktion des Gelenkes verursacht. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die Modulation des Verlaufs der AIA durch die T-Helfer (Th)-Zell-Zytokine Interleukin (IL)-17 und Interferon (IFN)- γ sowie deren Einfluss auf die Charakteristika primärer, Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten (FLS). Sowohl der Knock out von IFN- γ (IFN- $\gamma^{-/-}$) als auch die Neutralisation des Zytokins führten zu einer klinisch und histologisch sichtbaren Exazerbation der AIA. Folge des Fehlens bzw. der Hemmung von IFN- γ war die Veränderung der zellulären Immunantwort, was sich in einer erhöhten T-Zell-expansion und Sekretion proinflammatorischer Zytokine äußerte. Besonders auffällig war die verstärkte Expression Th17-assoziiierter Zytokine sowie des Th17-spezifischen Transkriptionsfaktors ROR γ t. Die Neutralisation von IFN- γ führte vor allem am Anfang der Immunisierungsphase zur Erhöhung der Th17-Antwort. Hingegen war die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3, der die suppressiven Eigenschaften regulatorischer T-Zellen (Treg) maßgeblich beeinflusst, durch arthritische IFN- $\gamma^{-/-}$ Milzzellen deutlich eingeschränkt. Die Depletion CD4⁺ Zellen konnte den schwereren Verlauf der AIA bei IFN- $\gamma^{-/-}$ Mangel signifikant mildern.

IL-17-defiziente Tiere zeigten dagegen nur geringfügig ausgeprägte Entzündungs- und Destruktionsmerkmale im arthritischen Kniegelenk. Die T-Zell-Antwort fiel bei IL-17-Mangel wesentlich geringer aus als bei WT-Tieren. Die klinische Reaktion der IL-17^{-/-} Tiere wurde durch CD4-Depletion nochmals abgeschwächt. Die Abwesenheit von IL-17 ließ die Expression des spezifischen Regulatoren-Markers FoxP3 im AIA-Verlauf weitgehend unbeeinflusst. Die durch anti-CD25-Antikörper vermittelte Depletion regulatorischer T-Zellen führte bei IL-17-Defizienz zu einer Exazerbation der Erkrankung. Interessant ist dies vor allem im Hinblick auf die bei CD25-

depletierten Wildtyp-Tieren festgestellte erhöhte Produktion von IL-17 bzw. Verstärkung der gesamten Th17-Antwort während der Progression der AIA.

Sowohl die Neutralisation von IFN- γ in IL-17-defizienten Mäusen als auch das komplette Fehlen beider Zytokine simultan führte zu einer deutlichen Verschlimmerung der Arthritis. In der akuten Phase der AIA zeichneten sich Lymphknoten und Milzen IL-17/IFN- γ -defizienter Tiere im Vergleich zum Wildtyp durch eine erhöhte Zytokinproduktion aus. Auffallend gering war die Expression des Th1-typischen Transkriptionsfaktors T-bet (T box transcription) bei IL-17-/IFN- γ -Defizienz. Weitere Kennzeichen arthritischer IL-17^{-/-}IFN- γ ^{-/-} Tiere waren ihre verringerten FoxP3-Spiegel. Letztendlich konnte der schwerere AIA-Verlauf, hervorgerufen durch den Verlust von IFN- γ , über den gleichzeitigen Wegfall des Entzündungsmediators IL-17 in der für beide Zytokine defizienten Maus, nicht kompensiert werden.

Um die Wirkung von IL-17 und IFN- γ auf die funktionellen Eigenschaften primärer Synoviozyten zu untersuchen, wurden Kokulturen mit Milzzellen von IL-17- oder IFN- γ -defizienten Tiere bzw. mit Zellen, die für beide Zytokine defizient waren, durchgeführt. Der Mangel an IFN- γ und die dadurch erhöhte Th17-Antwort stimulierte primäre FLS zur verstärkten Bildung Knorpel-degradierender Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Zeitgleich kam es zur reduzierten Expression der endogenen Inhibitoren dieser Enzyme (TIMPs). Des Weiteren zeichneten sich Kokultur-Überstände bei IFN- γ -Mangel durch erhöhte Konzentrationen der Entzündungs- und Destruktions-vermittelnden Zytokine IL-6 und RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) aus. Ohne IL-17 ließen sich Synoviozyten nur geringfügig zur Sekretion aktiver MMPs stimulieren, produzierten aber vermehrt TIMPs sowie den RANKL-Antagonisten Osteoprotegerin (OPG). Milzzellen IL-17/IFN- γ -defizienter Tiere aktivierten ähnlich wie IFN- γ ^{-/-} Zellen verstärkt das arthritische Potenzial primärer FLS. Der simultane Verlust des proinflammatorischen Zytokins IL-17 konnte die durch den IFN- γ -Mangel hervorgerufene Überproduktion Matrix-abbauender Proteasen und Osteoklastogenese-vermittelnder Zytokine wie RANKL allerdings nicht ausgleichen. Es lässt sich feststellen, dass IL-17 die Pathogenese der AIA zwar entscheidend vorantreibt, allerdings nicht als alleiniger Mediator des Entzündungsgeschehens anzusehen ist, sondern auch andere Th17-Zytokine wie IL-21 oder das für die Differenzierung der Th17-Population essentielle Zytokin IL-23 hierzu einen entscheidenden Beitrag leisten. Das vielfach als ausschließlich proinflammatorisch definierte Th1-Zytokin IFN- γ nimmt vor allem über die Beeinflussung der FoxP3-Expression und damit der Treg-Population eine immunmodulatorische Funktion in der akuten Phase der AIA ein.

2. Einleitung

2.1 Die Rheumatoide Arthritis (RA)

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung, die, wenn sie nicht rechtzeitig behandelt wird, zu einer starken Knorpel- und Knochendestruktion führen kann. Auf Grund des Vorkommen von Entzündungsprozessen in verschiedenen Gelenkbereichen gleichzeitig wird sie zudem auch als chronische Polyarthritis bezeichnet. In seltenen Fällen können auch Körperbereiche, wie z.B. Augen und innere Organe betroffen sein (Lee und Weinblatt 2001). Typisch für die RA ist ein schubförmiger Verlauf mit symmetrischem Befall der Gelenke. Prädilektionsstellen sind dabei Handgelenke, Metacarpophalangeal (MCP)- und Metatarsophalangealgelenke (MTP) sowie die proximalen Interphalangealgelenke (PIP) an Hand und Fuß, die distalen Interphalangealgelenke (DIP) bleiben meist ausgespart (Abb.1).

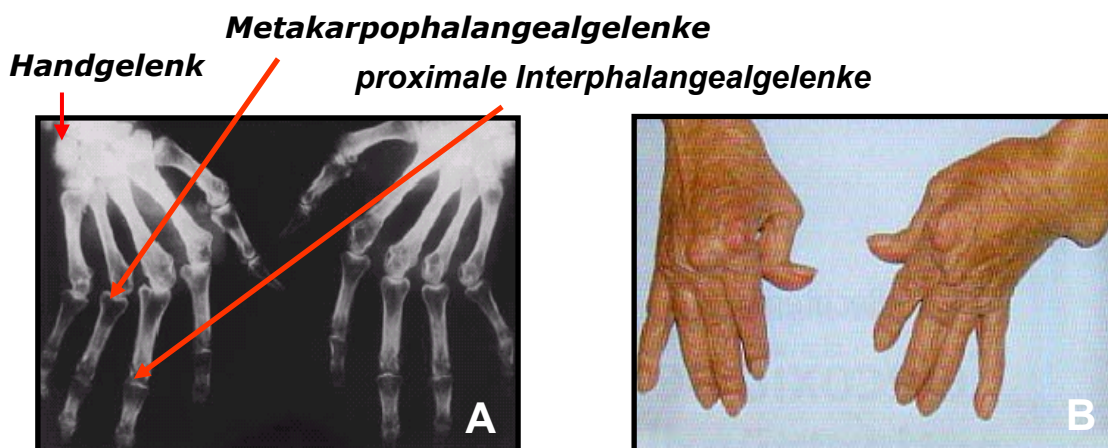


Abb.1 RA – Periphere Gelenkbeteiligung. A. Röntgenbild: vorkommende Begleitosteoporose und ausgeprägte erosive Veränderungen der Metakarpophalangealgelenke; B. Spätstadium: vorstehende Metakarpalköpfchen, deutliche Atrophie der Interossealmuskulatur; (Quelle: Thiemes Innere Medizin; Georg Thieme Verlag Stuttgart 2004)

Häufig zeigen sich die ersten Symptome der RA im Alter zwischen 30 und 50 Jahren. Nach der unspezifischen Vorphase entwickeln die meisten Rheumatiker klassische Symptome. Die ersten klinischen Zeichen der Erkrankung sind Schmerzen und Morgensteifigkeit der Gelenke. Im weiteren Verlauf kommt es dann zur Muskelatrophie und zur Schädigung des Bindegewebes mit beginnender Zerstörung des Gelenkknorpels und -knochen. In der Folge können Umbauprozesse am Gelenk und an periartikulären Strukturen zur Deformation und Versteifung bis hin zum kompletten Verlust der Gelenkfunktion führen. Die RA ist neben Sklerodermie und Diabetes mellitus Typ I eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen des Menschen,

an der in Deutschland etwa 800.000 Patienten leiden. Frauen sind dabei zwei- bis dreimal häufiger betroffen als Männer (Review: Alamanos und Drosos 2005).

Sowohl Ursache als auch Pathogenese der RA sind bis heute nicht vollständig geklärt (Überblick in Firestein 2003, McInnes und Schett 2007). Umweltfaktoren wie z.B. Ernährung, Medikamente, Toxine, aber auch Infektionen können Induktion, Stärke und Progressionsrate der Krankheit beeinflussen. Aufgrund des häufigeren Auftretens bei Frauen werden auch endokrine Faktoren als Ursache diskutiert (van Zeben et al., 1990). Genetische Anlagen sind für die Entwicklung der RA ebenfalls von Bedeutung. Anhand mehrerer Studien wurde festgestellt, dass bei einem Ausbruch der Erkrankung bei monozygoten Geschwistern in 32% der Fälle auch der Zwillingspartner unter der Erkrankung leidet (Silman et al., 1993). Die Ursache für die Erkrankung wird vor allem in einer genetischen Prädisposition bestimmter HLA-Gene gesehen. Untersuchungen ergaben, dass im Falle der RA vorwiegend der HLA-Haplotyp DRB1*04 positiv mit der Erkrankung assoziiert ist, da 60-70% der Patienten diesen Haplotyp tragen, aber nur 30% der Kontrollgruppen (Panayi et al., 1980). Neben den Subtypen HLA-DRB1*04 sind ebenfalls die Typen HLA-DRB1*01, HLA-DRB1*10, HLA-DRB1*11 und HLA-DRB1*14 mit der RA assoziiert (O'Dell et al., 1998; Newton et al., 2004). Betrachtet man die RA-assoziierten HLA-DRB1-Allele, fällt auf, dass ihnen allen ein Sequenzmotiv gemeinsam ist, das als „**Shared Epitope**“ (**SE**) bezeichnet wird (Gregersen et al., 1987). Das „Shared Epitope“ in der dritten hypervariablen Region der β -Kette des HLA-DR-Moleküls vom Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-II ist sowohl an der Selektion von T-Helfer (Th)-Zellen während der Entwicklung im Thymus als auch an der Antigenpräsentation gegenüber $CD4^+$ Th-Zellen in der Peripherie beteiligt. Die SE-Hypothese sieht in dieser konservierten Aminosäuresequenz die Grundlage der genetisch bedingten Suszeptibilität. Bisher unbekannte rheumarelevante Antigene könnten bevorzugt an diese Region ankoppeln, die RA induzieren bzw. die Schwere der Arthritis modulieren (Lipsky et al., 1999). Der SE-Nachweis ist mit einem erhöhten Risiko an RA zu erkranken assoziiert und kann in der Frühphase die Diagnose der Krankheit erleichtern.

Neuere Studien weisen darauf hin, dass das Rauchen in Zusammenhang mit HLA-DRB „Shared Epitopen“ ein wichtiger Umweltfaktor ist, der das Risiko für die Entwicklung von RA-spezifischen Immunreaktionen erhöht. Es gibt Hinweise darauf, dass Rauchen die Entstehung von zyklisch zitruellinierten Peptiden (CCP) begünstigt (Klareskog et al., 2006). Zitrullin ist eine Aminosäure, die vorwiegend im Gerinnungsfaktor Fibrin vorkommt. Zitruellinierte Peptide werden bei der Blutgerinnung und auch bei Entzündungsprozessen in Gelenken verstärkt freigesetzt. Sie konnten innerhalb des entzündeten Synovialgewebes und als zirkulierende Antigene in der

Gelenkflüssigkeit von Patienten mit RA nachgewiesen werden. Offensichtlich unterstützt die CCP-Freisetzung während der Entzündung die Entwicklung der RA. Mitunter können auch sogenannte „**Superantigene**“ die Krankheit auslösen. Es handelt sich dabei um Produkte, die von Staphylokokken, Streptokokken oder *Mycoplasma arthritidis* produziert werden. Superantigene vernetzen HLA-DR-Moleküle dauerhaft mit V β -Segmenten von T-Zell-Rezeptoren. Dies führt zu einer Stimulation der T-Zellen, ohne dass eine spezifische Erkennung eines MHC-II-präsentierten Antigens benötigt wird (Herman et al., 1991) (Abb.2).

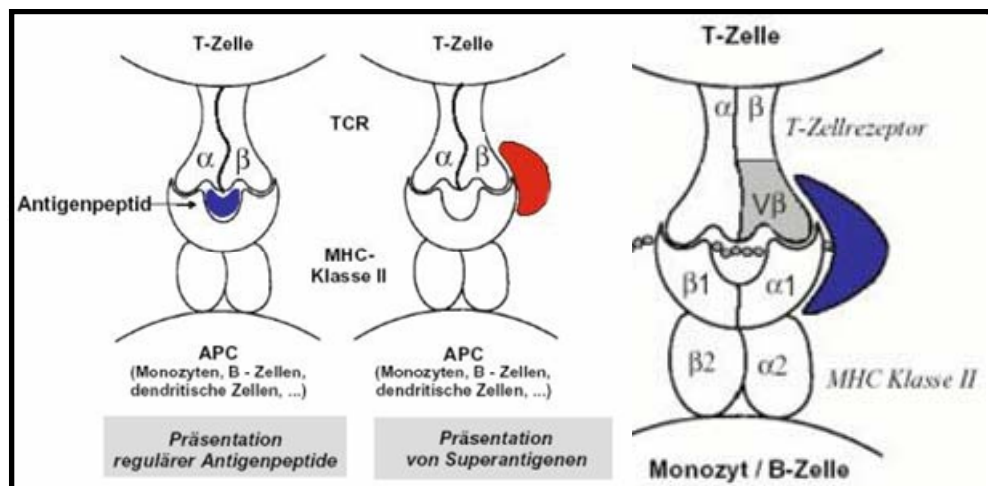


Abb.2 Präsentation von Superantigenen. Antigenpeptid bindet in der MHC-II-Furche, während Superantigene außerhalb der Furche vom MHC-II-Komplex binden. Bakterielle Superantigene gelangen durch Diffusion an ihre Bindungsstellen (Quelle: Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Thieme Verlage KG 2006).

Ein alternatives Erklärungsmodell ist das sogenannte „**Molekulare Mimikry**“ (van Eden et al., 1985; Fujinami et al., 1989). Es basiert auf der Ähnlichkeit bakterieller oder viraler Antigen determinanten mit autologen Strukturkomponenten des Gelenkes. Dies erhöht die Gefahr einer immunologischen Kreuzreaktivität und somit eines infektiös getriggerten Anstoßes einer chronischen, von B- und T-Lymphozyten vermittelten arthritogenen Autoimmunität. Indiz für das molekulare Mimikry-Modell ist beispielsweise eine homologe Struktur zwischen dem „Shared Epitope“ des körpereigenen HLA-DRB1*04 und der gp-110-Untereinheit des Epstein-Barr-Virus-codierten Proteins bzw. dem Hitzeschockprotein dnaJ von *E.coli*. Bei Patienten mit dieser Struktur in der MHC-II-Region kann es zu Kreuzreaktivitäten kommen und letztendlich zur Induktion bzw. Progression der RA beitragen (Venables et al., 1988; Albani et al., 1995; Saal et al., 1999). Den dargestellten Pathogenesemodellen fehlt jedoch der experimentelle Nachweis eines kausalen infektiösen Agens bei RA-Patienten, der bis heute auch unter Verwendung sehr sensitiver Methoden in zahlreichen Studien nicht gelungen ist.

Charakteristisch für die RA ist die Ausbildung einer Synovialitis (Entzündung der Synovialmembran) in der akuten Phase, die anschließend in eine chronische Phase übergeht. Die gesunde Synovialmembran ist aus einer oberflächlichen Schicht, der gefäßarmen Intima (1-2 Zellschichten), und einer tiefen Schicht der Subintima aufgebaut. Sie ummantelt die Gelenkkapsel und bildet die für eine optimale Gelenkfunktion notwendige Synovialflüssigkeit. In der akuten Phase der RA baut sich eine bis auf 10 Zellschichten verdickte Intima auf, bestehend aus proliferierenden synovialen Fibroblasten und eingewanderten Makrophagen (Kelly et al., 1988; Burmester et al., 1997). Die Subintima zeichnet sich durch die Infiltration von zahlreichen Granulozyten und Monozyten aus. Durch einen mit Neovaskularisation verbundenen Vorgang kommt es in der Subintima zur Einwanderung von Makrophagen, Plasmazellen sowie B- und T-Zellen (Ziff et al., 1989). Die Zellinfiltrate produzieren Entzündungsmediatoren, wie z.B. die Zytokine IL-1, IL-6, IL-17, IL-18, TNF- α und GM-CSF und tragen somit zur Bildung der Synovialitis bei (McInnes et al., 2005). Die chronische Phase zeichnet sich durch Proliferation der Synovialmembran und Ausbildung eines hoch vaskularisierten Granulationsgewebes (Pannus) aus. Dieses besteht aus dicht beieinander liegenden, proliferierenden mesenchymalen Zellen, die hochaktiv sind und knorpelabbauende Enzyme wie Kollagenasen und Stromelysine (z.B. Stromelysin 1) produzieren. Es enthält wenige Entzündungszellen und befindet sich zwischen der Synovialmembran und der Knochen-Knorpel-Schicht. In dieser Region fehlt dem Knochen der schützende Knorpelüberzug, so dass der Knochen dem invasiv-destruktiven Wachstum des Pannus schutzlos ausgeliefert ist. Die Proliferationshemmung durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte ist im Pannus gestört (Lafyatis et al., 1989). Der Pannus wird für die Knorpel- und Knochen-schädigung verantwortlich gemacht, die letztendlich zur Zerstörung der Struktur und Funktion des Gelenks führt. Neben den Zellen der Immunabwehr (Makrophagen, B- und T-Zellen) sind auch andere Zellen, wie Osteoklasten, Osteoblasten, Chondrozyten und Synoviozyten an den Prozessen beteiligt. Sie sind in der Lage, sich über Mediatoren wie z.B. Zytokine oder über Zell-Zell-Kontakt gegenseitig zu beeinflussen und Enzyme wie Matrix-Metalloproteasen und Kathepsine freizusetzen. Die Pathogenese der RA beruht auf einem Zusammenspiel aus synovialer Hyperplasie, Entzündung und einer veränderten Immunantwort (Gay et al., 1993).

2.2 Experimentelle Arthritismodelle

2.2.1 Übersicht

Tiermodelle, wie die Antigen-induzierte Arthritis (AIA), dienen für ein besseres Verständnis der immunpathogenetischen Vorgänge in der RA. Durch sie können Krankheitsverläufe nachgestellt und Medikamente hinsichtlich ihrer Wirkung und Verträglichkeit getestet werden. Die in der Tabelle 1 aufgeführten experimentellen Arthritismodelle zeigen große Ähnlichkeit mit der RA hinsichtlich der histologischen Bewertung, dem Verlauf der chronischen Phase und den immunologischen Reaktionen. Neben den substanzvermittelten Modellen (Tab.1) gibt es ebenfalls Modellarten, die auf Grund der Überexpression von humanen TNF (hTNF-tg-Modell) oder der spezifischen T-Zellrezeptorexpression (K/BxN-Modell) stark der RA gleichen. Jedoch kann mit keinem der Tiermodelle die Komplexität der RA vollständig simuliert werden.

Tab.1 Verschiedene substanzvermittelte induzierte Arthritismodelle.

Modellart	Spezies	Kennzeichen
Adjuvans- Arthritis (AA)	Ratte	Injektion von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in IFA \Rightarrow Polyarthritis (Pearson, 1956)
Antigen-induzierte Arthritis (AIA)	Kaninchen, Meerschweinchen, Maus, Ratte	Injektion von Ag (mBSA; katOva) in CFA \Rightarrow monoartikuläre Arthritis (Dumonde und Glynn, 1962)
Kollagen-induzierte Arthritis (CIA)	Maus, Ratte, Affen	Injektion von Kollagen Typ II in CFA \Rightarrow Polyarthritis (Trentham et al., 1977; Courtenay et al., 1980)
Proteoglykan-induzierte Arthritis (PGIA)	Maus	Injektion von Proteoglykan in CFA \Rightarrow Polyarthritis (Glant et al., 1987)
Streptokokken-Zellwand-induzierte Arthritis (SCWIA)	Maus, Ratte	Injektion von Zellwandbestandteilen von <i>Streptococcus pyogenes</i> \Rightarrow Polyarthritis (Cromartie et al., 1977)
Öl-(OIA) und Pristan-induzierte Arthritis (PIA)	Maus, Ratte	Injektion von Mineralöl (IFA) oder synthetischem Öl (Pristan) \Rightarrow Polyarthritis (Potter und Wax, 1981; Kleinau et al., 1991)
Glukose-6-Phosphat-Isomerase- induzierte Arthritis (G6PIA)	Maus	Injektion von G6PI in CFA \Rightarrow Polyarthritis (Schubert et al., 2004)

(Ag = Antigen; CFA = komplettes Freund'sches Adjuvans, IFA = inkomplettes Freund'sches Adjuvans, mBSA = methyliertes Rinderserumalbumin, katOva = kationisches Ovalbumin)

2.2.2 Das Modell der Antigen-induzierten Arthritis (AIA)

Die AIA wurde nach der Erstbeschreibung am Kaninchen (Dumonde und Glynn, 1962) von Brackertz et al. (1977) an die Maus adaptiert. Die für dieses Modell geeigneten Mausstämme werden durch zweimalige subkutane Injektion mit einem Proteinantigen in komplettem Freund'schen Adjuvans immunisiert. Als Antigen kann methyliertes Rinderserumalbumin (mBSA) oder kationisches Ovalbumin (katOva) verwendet werden. Die induzierte zelluläre und humorale Immunantwort wird durch intraperitoneale Injektion abgetöteter *Bordetella pertussis*-Keime verstärkt. Letztendlich wird die Arthritis durch intraartikuläre Injektion des bei den Immunisierungen verwendeten Antigens ausgelöst. Es entsteht eine akute Synovialitis, die in eine chronische Entzündung übergeht, was schließlich zur Gelenkdestruktion führt. Voraussetzung für die Chronifizierung der AIA ist die Persistenz des verwendeten Antigens im Gelenk. Erreicht wird dies über kationische Proteinantigene, die an die negativ geladene Knorpelmatrix binden können. Die auftretenden histopathologischen Veränderungen ähneln der chronischen Entzündung und Gelenkschädigung der RA.

In der akuten Phase der AIA kommt es verstärkt zum Einwandern von neutrophilen Granulozyten in den Gelenkspalt und das angrenzende Gewebe. Nachfolgend reichern sich mononukleäre Zellen in der Synovialmembran an und eine Hyperplasie der synovialen Deckzellschicht tritt auf. Bereits Stunden nach der Arthritisinduktion werden erste Schädigungen an der Knorpeloberfläche sichtbar. Es zeigen sich ein zunehmender Verlust der Proteoglykane sowie Chondrozytennekrosen (Henzgen et al., 1996). Ab dem Tag 6, zu Beginn der chronischen Phase, kommt es zur Pannusbildung, welche fortschreitend den Gelenkknorpel und den subchondralen Knochen zerstört. Die AIA ist neben der Streptokokken-Zellwand-induzierten Arthritis das einzige Arthritismodell, bei dem durch erneute systemische oder lokale Gabe des Antigens ein akuter, die chronische Phase überlagernder Entzündungsschub ausgelöst werden kann (Lens et al., 1986; Buchner et al., 1995). Diese Flare-up-Reaktionen ähnelten den wiederkehrenden Exazerbationen der RA. Übereinstimmungen zwischen AIA und RA sind auch hinsichtlich bestimmter immunologischer Vorgänge zu finden. So konnte gezeigt werden, dass die AIA stark T-Zell-abhängig ist (Petrov et al., 1996; Pohlers et al., 2004). CD8⁺ Th-Zellen, die MHC-I-präsentierte Antigene erkennen, konnte keine Bedeutung bei der Induktion und Aufrechterhaltung der AIA zugeordnet werden, während CD4⁺ Th-Zellen, die durch MHC-II-präsentierte Antigene stimuliert werden, eine essentielle Rolle bei der Pathogenese der AIA spielen. Der Nachweis erfolgte hierbei über entsprechende Transfer- und Depletionsexperimente.

2.3 Bedeutung verschiedener Th-Subpopulationen in der RA

2.3.1 Th1/Th2-Zellen

Mosmann et al. (1986) unterteilten die $CD4^+$ Th-Zellen anhand der von ihnen sekretierten Zytokine in die sich wechselseitig regulierenden Th1- und Th2-Subtypen (Gajewski und Fitch, 1988; Schindler et al., 2001). Die Th1-Zellen vermitteln zelluläre inflammatorische Immunreaktionen. In den meisten Fällen stimulieren sie antigentragende Makrophagen zur Erhöhung ihrer antibakteriellen Aktivität (Nathan 1983). Sie veranlassen die Fusion der Lysosomen mit Vesikeln, welche phagozytierte Bakterien enthalten. Th1-Zellen setzen nach Aktivierung proinflammatorische Zytokine wie z.B. $IFN-\gamma$ frei, die vor allem Makrophagen und Monozyten an den Infektionsherd locken und inflammatorische Prozesse auslösen. Sie verstärken die Expression der MHC- und B7-1-Moleküle auf Makrophagen. Über die Sekretion von $IFN-\gamma$ regen die Th1-Zellen phagozytierende Makrophagen zur Produktion von IL-12, dem proinflammatorischen Zytokin $TNF-\alpha$ und von Stickstoffmonoxid (NO) an. Über NO können Makrophagen intrazelluläre Erreger direkt eliminieren, während IL-12 die $IFN-\gamma$ -Produktion der Th1-Zellen in einem positiven Rückkopplungsmechanismus anregt (Sher und Coffman 1992; Trinchieri et al., 1995).

Die Differenzierung von einer naiven Th-Zelle (Th0) zu einer Th1-Vorläuferzelle erfolgt über Stimulation des T-Zell-Rezeptors und wird ebenfalls über das zur IL-12-Familie gehörende IL-27 vermittelt (Pflanz et al., 2002). Beide Initiierungssignale aktivieren dabei STAT1 und sorgen somit letztendlich für die Expression des für die Th1-Zelle typischen Transkriptionsfaktors T-bet (T box expressed in T cells) (Szabo et al., 2000; Hibbert et al., 2003). T-bet selbst ist ein potenzieller Faktor für die Expressionsregulation des $IFN-\gamma$ -Gens. In dieser Phase der Th1-Differenzierung stimuliert das parakrin wirkende $IFN-\gamma$ über T-bet die Hochregulation der IL-12R β 2-Kette. Durch Fusion der IL-12R β 2-Kette mit der auf naiven Th0-Zellen bereits vorhandenen IL-12R β 1-Kette erfolgt nach Stimulation der Th1-Vorläuferzelle mit IL-12 über STAT4 die vermehrte Produktion von $IFN-\gamma$. Gleichzeitig kommt es zu Expression der IL-18R α -Kette. Die Th1-Effektorzelle ist jetzt in der Lage, $IFN-\gamma$ über einen T-Zell-Rezeptor-abhängigen oder T-Zell-Rezeptor-unabhängigen Signalweg (über IL-12/IL-18) zu produzieren (Robinson et al., 1997; Yang et al., 1999). Th1-Zellen sekretieren neben $IFN-\gamma$ in hohem Maße auch IL-2 und $TNF-\alpha/\beta$ (Abb.3).

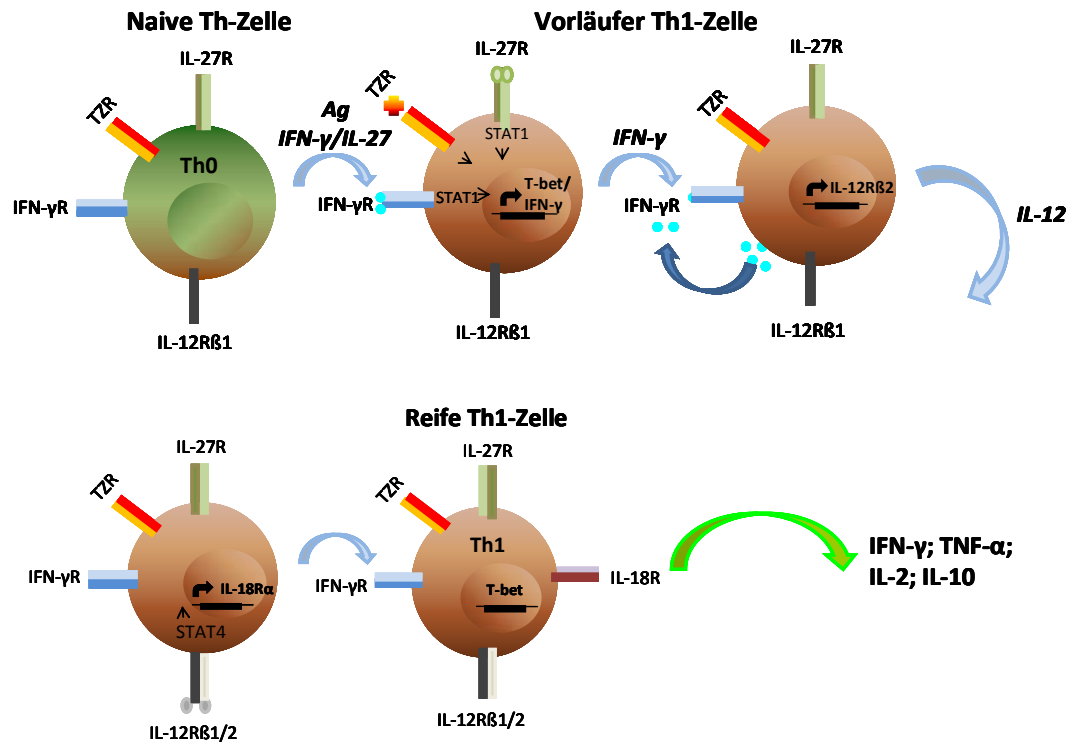


Abb.3 Differenzierungsschema der Th1-Zellen. Details siehe Text

IFN- γ hat offensichtliche sowohl eine proinflammatorische als auch eine immunmodulatorische Funktion. Proinflammatorische Effekte von IFN- γ sind neben der Aktivierung von Makrophagen auch die Induktion der Expression von MHC-II-Molekülen auf einer Reihe von Zelltypen, der Klassenwechsel zu Immunglobulin (Ig) G2a und die verstärkte VCAM-1- sowie MMP-Expression durch synoviale Fibroblasten (FLS) (Nathan et al., 1983; Schneeberger et al., 1986; Jahn et al., 1987; Finkelmann et al., 1988). Im Gegensatz dazu kann IFN- γ aber auch die Differenzierung von Th2-Zellen negativ beeinflussen. Th2-Zellen exprimieren im Vergleich zu Th1-Zellen den für sie spezifischen Transkriptionsfaktor GATA3 (GATA binding protein 3) (Hwang et al., 2005) und sezernieren spezifisch die Zytokine IL-4 und IL-13 (Zheng et al., 1997). B-Zellen werden so zur Produktion und Sekretion von Antikörpern angeregt und die humorale Immunantwort somit gefördert. Dabei erfolgt zunächst die Bildung von IgM-Antikörpern. Nach dem Isotypwechsel wird dann verstärkt IgG1 sowie IgA und IgE synthetisiert (Paquet et al., 1987).

In den letzten Jahren wurde die ursprüngliche Th1/Th2-Dichotomie durchbrochen und weitere Populationen wie regulatorische T-Zellen (Treg) oder die CD4⁺ IL-17-Produzenten (Th17) kamen hinzu. Dabei zeigt sich immer mehr, dass die von den verschiedenen Th-Subtypen sezernierten Zytokine vielfältige Effektorfunktionen wahrnehmen und somit ein zentraler Bestandteil der Immunregulation sind.

2.3.2 Th17-Zellen

2.3.2.1 Th17-Differenzierung bei der Maus

Th17-Zellen stellen neben Th1/Th2-Zellen eine weitere, relativ neue Subpopulation dar, die noch nicht vollständig charakterisiert ist. In den letzten Jahren konnten unter anderem spezifische Zytokine, Transkriptionsfaktoren und Differenzierungsmechanismen dieses Zelltyps identifiziert werden. Dennoch gibt es zur Regulation und Wirkmechanismen noch viele offene Fragen. Besonderes Merkmal der Th17-Zellen ist die Produktion von IL-17A (in der Literatur häufig nur als IL-17 bezeichnet) und IL-17F. Beide Zytokine gehören wie auch IL-17B, C, D und E zur IL-17-Familie (Review: Kamradt 2007; Gabay und Mc Innes, 2009). Nach den bisherigen Erkenntnissen werden IL-17A und F nur von Th17-Zellen gebildet und sekretiert. Die IL-17B-Expression wurde im inflammatorischen Knorpel von arthritischen Mäusen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wird IL-17C von einer Vielzahl von Zellen wie z.B. CD4⁺ T-Zellen, CD11b⁺ MHC-Klasse II⁺ Makrophagen oder CD11c⁺ MHC-Klasse II⁺ dendritischen Zellen produziert (Yamaguchi et al. 2007). Die IL-17F-Expression ist im Vergleich zu IL-17A deutlich reduziert. Beide Zytokine sind in ihrer Funktion sehr ähnlich und induzieren in verschiedenen Geweben und Zelltypen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Metalloproteasen (Hymowitz et al., 2001; Yamaguchi et al., 2007). Neben IL-17A und F produzieren Th17-Zellen ebenfalls die Zytokine IL-21 und IL-22. Weder IL-21 noch IL-22 sind exklusiv Th17-Zytokine, werden aber dennoch bevorzugt von dieser Subpopulation exprimiert. Im Gegensatz zur Th1- bzw. Th2-Differenzierung, die zum größten Teil von ihren Effektor-Zytokinen (IFN- γ bzw. IL-4) abhängig ist, scheinen Th17-Zellen keine auto- bzw. parakrine IL-17-Stimulation während ihrer Entwicklung zu benötigen. Für die Generierung und Differenzierung von Th17-Zellen sind vorwiegend die Zytokine TGF- β und IL-6 verantwortlich. IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches vermehrt von Zellen des angeborenen Immunsystems produziert wird und eine hohe Affinität zu Toll-like- sowie C-type Lektin-Rezeptoren besitzt. Das Zytokin TGF- β kann im Vergleich zu IL-6 immunologisch sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte vermitteln. So konnten Wan et al. (2007) zeigen, dass ein Mangel an TGF- β mit einem lymphoproliferativen Krankheitsbild assoziiert ist. Es ist vor allem dazu in der Lage, über die Aktivierung verschiedener SMAD-Proteine die Entwicklung von Treg-Zellen zu modulieren. IL-6 induziert in naiven CD4⁺ Zellen die Phosphorylierung von STAT3, dem initialen Schritt der Th17-Differenzierung. Das Zusammenspiel von IL-6 und TGF- β reguliert letztendlich unter Mitwirkung weiterer Mediatoren die Expression der Th17-typischen Transkriptionsfaktoren ROR γ t und ROR α (retinoid-related orphan receptor). Es ist ebenfalls bekannt, dass TGF- β für eine gesteigerte Expression von IL-6 α - und der gp130-

mRNA (Bestandteil des IL-6 Rezeptor) sorgen kann. Dies führt zu einer erhöhten Produktion von ROR γ t in CD4⁺ T-Zellen. Ähnlich wie bei den Th1-Zellen T-bet und GATA3 bei Th2-Zellen, so ist ROR γ t mitentscheidend für die genetische Programmierung der Th17-Zellen. Ivanov et al. (2006) fanden heraus, dass ein Verlust von ROR γ t in T-Zellen die Entstehung von Myelin-spezifischen Th17-Zellen verhindert und somit auch die Entwicklung der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) in entsprechend immunisierten Mäusen hemmt. Weitere Experimente mit ROR γ t-GFP-Reporter-Mäusen zeigten die Existenz einer IL-17-positiven Zellpopulation, die vorrangig in der intestinalen Lamina propria aufzufinden war und sich in Abhängigkeit von der ROR γ t-Expression entwickelte. Dies bestätigt die zentrale Rolle von ROR γ t bei der Differenzierung der Th17-Zellen. Im Verlauf der Th17-Entwicklung wird über das Zusammenwirken von STAT3 und ROR γ t die Produktion von IL-21 induziert. IL-21 wirkt unter anderem als autokriner Botenstoff, der in Th17-Zellen ein Signal stimuliert, welches für deren Amplifikation unentbehrlich ist. Die Zytokine IL-6 und IL-21 sind mitverantwortlich für die Expression des IL-23-Rezeptor (IL-23R) (Xiao et al., 2008). Die Stimulation des Rezeptors durch IL-23-Bindung mit der nachgeschalteten Signaltransduktion bis hin zur Aktivierung von ROR γ t trägt zur Stabilisierung des Th17-Phänotyps bei (Abb.4). Es ist bisher noch nicht vollständig geklärt, inwieweit ROR γ t die Gene von IL-17A, IL-17F, IL-21 und IL-22 direkt transaktiviert und inwieweit die Differenzierungseffekte in Th17-Zellen neben ROR γ t auch von ROR α gesteuert werden. Yang et al. (2008) zeigten in jüngsten Studien, dass der Verlust eines der beiden Transkriptionsfaktoren zu einem partiellen Expressionsverlust der Th17-Zytokine führt und die Abwesenheit beider ROR-Transkriptionsfaktoren die Aufhebung der Th17-Differenzierung zur Folge hat.

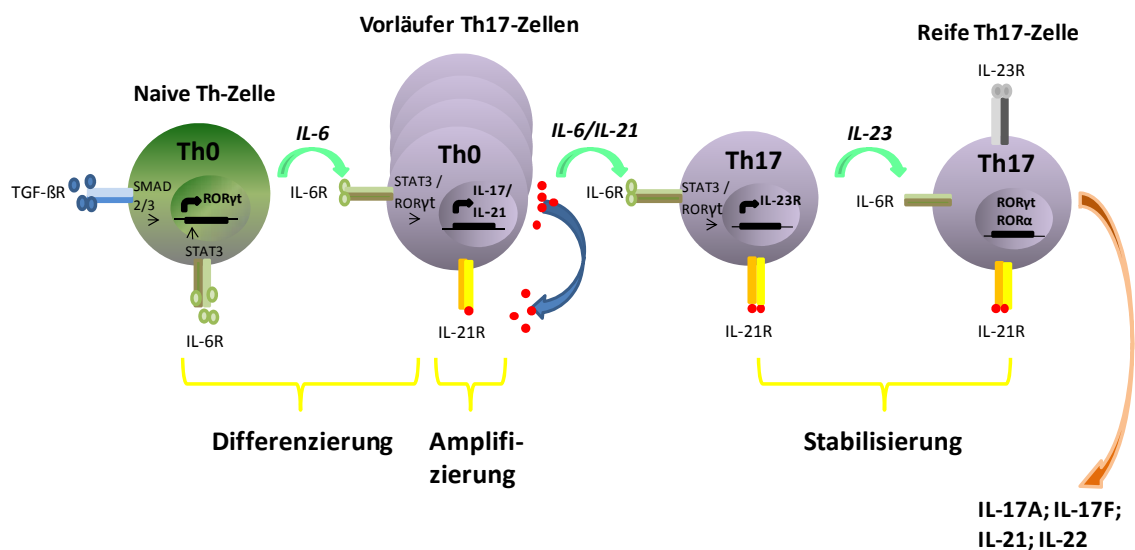


Abb.4 Differenzierungsschema der Th17-Zellen. Details siehe Text

Eine aktuelle Arbeit von Brustle et al. (2007) beschreibt, dass neben ROR γ t auch der Transkriptionsfaktor IRF4 (interferon regulatory factor-4) eine essentielle Rolle in der Entwicklung der Th17-Zellen einnimmt. IRF4-defiziente Mäuse produzierten im Vergleich zum Wildtyp kein IL-17 und wiesen eine geringere EAE-Suszeptibilität auf.

2.3.2.2 Th17-Differenzierung beim Menschen

Veröffentlichungen von Sallusto et al. (2007) sowie De Waal Malefyt et al. (2007) verdeutlichen, dass sich die Th17-Entwicklung in Mensch und Maus fundamental unterscheidet. Während TGF- β bei der Th17-Differenzierung der Maus unverzichtbar ist, so hat TGF- β für die Th17-Differenzierung und IL-17-Produktion beim Menschen keine Bedeutung. Überraschend stellten beide Arbeitsgruppen fest, dass TGF- β die IL-17-Sekretion (human) inhibiert. Im Gegensatz dazu sorgt das Zytokin IL-1 für eine effektive IL-17-Expression in CD4 $^{+}$ T-Zellen des Menschen, obwohl der Transkriptionsfaktor ROR γ t nur zum Teil induziert wird. IL-6 spielt ebenso wie in der Maus auch bei der humanen Th17-Entwicklung eine wichtige Rolle. Dies allerdings nur in Verbindung mit weiteren Zytokinen. Nach Kombination von IL-6 und IL-1 zeigten Sallusto et al. (2007) eine erhöhte ROR γ t-Expression und eine daraus resultierende gesteigerte IL-17-Produktion. Die Bedeutung von IL-23 bei der humanen Th17-Differenzierung wird hingegen kontrovers diskutiert. Während Sallusto et al. (2007) eine erhöhte IL-17-Expression nach Kostimulation mit IL-1 und IL-23 feststellen konnten, erzielten De Waal Malefyt et al. (2007) mit einer IL-1-Einzelstimulation eine stärkere IL-17-Sekretion. Untersuchungen haben gezeigt (De Waal Malefyt et al., 2007), dass es sich bei der humanen Th17-Subpopulation vermutlich um zwei IL-17-produzierende Zelltypen handelt. Zum einen die IL-23R $^{+}$ CD4 $^{+}$ Gedächtniszellen, welche die Hauptproduzenten von IL-17 darstellen und zum anderen die IL-23R $^{-}$ CD4 $^{+}$ Gedächtniszellen, die spenderabhängig unterschiedlich stark IL-17 produzieren. Im Gegensatz zu murinen IL17-Produzenten sezernieren humane Th17-Zellen neben IL-17A und F auch große Mengen an IL-22. Die Bedeutung von IL-21, welches bei der Th17-Differenzierung der Maus als autokriner Regulator fungiert, ist für die humane Th17-Entwicklung noch weitgehend unaufgeklärt. Die Funktion von IL-23, das in der Maus den Th17-Phänotyp stabilisiert, wird im humanen System von IL-2 übernommen. De Waal Malefyt et al. (2007) stellten fest, dass nach Stimulation mit IL-2 die IL-17-Produktion nochmals deutlich ansteigt und lieferten somit einen weiteren Beweis für eine Spezies-spezifische Regulation der Th17-Entwicklung. Immer mehr Studien zeigen nicht nur Speziesunterschiede auf, sondern weisen auch auf die Existenz verschiedener Th17-Subpopulationen hin. Stimulationsabhängig können humane Th17-Zellen nicht nur IL-17, sondern auch INF- γ produzieren (Wilson et al., 2007). Ähnliche Phänomene beobachteten Xu et al. (2007) bei

Experimenten mit murinen $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen (Treg-Zellen), die *in vitro* einen Wechsel zum Th17- Phänotyp vollziehen konnten.

2.3.3 Treg-Zellen

Das Immunsystem ist befähigt, zwischen körperfremden und körpereigenen Antigenen zu unterscheiden und somit in der Lage, eine Vielfalt an pathogenen Antigenen zu erkennen und gleichzeitig Autoimmunreaktionen zu verhindern. Es gibt viele Beweise dafür, dass das Immunsystem eine Population von T-Zellen bereitstellt, die so genannten regulatorischen T-Zellen (Treg), mit deren Hilfe der Organismus in der Lage ist, die Entwicklung von Autoimmunität in der Peripherie zu kontrollieren. Diese Zellen tragen einen wichtigen Teil zur Entstehung und Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz bei und sind auf eine Suppression der Immunantwort spezialisiert. Eine Störung in der Entwicklung oder Funktion dieser Population führt häufig zu autoimmunen und inflammatorischen Erkrankungen. Diese Befunde wurden mittels verschiedener Krankheitsmodelle sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untermauert. Während Autoimmunkrankheiten wie Typ1 Diabetes, Rheumatoide Arthritis und andere chronisch inflammatorische Krankheiten wie Asthma und Colitis durch Treg-Zellen limitiert werden, sind sie andererseits teilweise in der Lage, positive Effekte wie die Immunantwort auf parasitäre und virale Infektionen zu blockieren sowie die Anti-Tumor-Immunität durch therapeutische Vakzine zu minimieren. Treg-Zellen exprimieren in hohem Maße den Transkriptionsfaktor FoxP3 sowie konstitutiv das Oberflächenmolekül CD25 (α -Untereinheit des IL-2R). Während CD25 auch bei aktivierten Effektor-T-Zellen und B-Zellen vorkommt (Knoechel et al. 2005), ist Foxp3 aktuell der beste und zumindest im murinen System der exklusive Marker zur Identifizierung von Treg-Zellen auf molekularer Ebene. Bei FoxP3 handelt es sich um einen transkriptionellen Repressionsfaktor der Forkhead/winged Helix-Familie. Mittlerweile werden die regulatorischen T-Zellen bereits in vier Subklassen untergliedert, die „**Tr1-Zellen**“, die „**Th3-Zellen**“ sowie die „**CD4⁺ und CD8⁺ Treg-Zellen**“. Die Tr1- und Th3-Zellen sind in ihrer Funktionalität ähnlich. Beide Zelltypen werden auch als $CD4^+CD25^-FoxP3^-$ Zellen bezeichnet und üben ihre immun-suppressive Wirkung vorwiegend über die Sekretion von IL-10 aus (Bluestone et al., 2005). Die CD8⁺ Treg-Zellen hingegen zeichnen sich durch die Expression von CD25 und Foxp3 (gezeigt nach anti-CD3-Stimulation *in vitro*) aus und supprimieren über einen Zell-Zell-Kontakt-abhängigen Mechanismus (Bisikirska et al., 2005). Die CD4⁺ Treg-Zellen sind der am besten charakterisierte Zelltyp unter den Regulatoren. Hinsichtlich Wirkungsweise und Regulation der typischen Treg-Zell-Marker CD25 und vor allem FoxP3 ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) konnten bislang bei dieser Subpopulation die größten Fortschritte erzielt werden.

Die enorme Bedeutung des Repressionsfaktors FoxP3 für die Entwicklung und Funktion von Treg-Zellen und somit für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz zeigt sich bei Patienten mit dem IPEX-Syndrom (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome), die verschiedene Mutationen im FoxP3-Gen aufweisen und dies letztendlich zur Expression eines funktionsunfähigen Proteins führt (Ziegler et al., 2007). Die „Scurfy-Maus“, bei deren Entwicklung eine Lymphozytenhyperaktivität, eine erhöhte Produktion inflammatorischer Zytokine und autoimmune Symptome ähnlich wie beim IPEX-Syndrom des Menschen beobachtet werden können, exprimieren ebenfalls ein mutiertes FoxP3-Gen. Des Weiteren ist ihr Phänotyp durch eine verringerte FoxP3-Expression geprägt (Brunkow et al., 2001; Fontenot et al., 2003). Hori et al. (2003) konnten durch eine retrovirale Transduktion CD25⁺CD4⁺ T-Zellen mit dem FoxP3-Gen einen Treg-ähnlichen Zelltyp generieren, der die Fähigkeit besaß, die Proliferation von Effektor-T-Zellen *in vitro* zu supprimieren und die Colitis-Entwicklung *in vivo* zu inhibieren. FoxP3 stimuliert neben der Hochregulation von CD25 auch die Expression weiterer typischer Treg-assoziiierter Zelloberflächenmoleküle wie CTLA-4 (cytotoxic T cell-associated antigen-4), GITR (glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene/protein) und Folatrezeptor (FR4) und sorgt für die Repression der Gene von IL-2, IFN- γ und IL-4 (Bettelli et al. 2005; Wu et al., 2006). FoxP3 kann somit als der zentrale Regulator des zellulären Programms dieses Zelltyps bezeichnet werden.

Vor allem für die CD4⁺ Treg-Zellen wurden mögliche Effektormechanismen aufgeklärt. So kann eine Suppression beispielsweise über inhibitorische Zytokine erfolgen. Zu den Mediatoren zählen hierbei das bereits erwähnte Zytokin IL-10, aber auch TGF- β sowie das nach bisherigen Erkenntnissen größtenteils von Treg produzierte IL-35 (Chen et al., 2003; Fahlen et al., 2005). Die generelle Bedeutung von IL-10 und TGF- β als Vermittler der suppressiven Wirkung von Treg-Zellen kann aufgrund kontroverser Ergebnisse sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Frage gestellt werden und scheint stark vom verwendeten experimentellen Modell abhängig zu sein (Shevach et al., 2006; Vignali et al., 2008). Verschiedene Arbeiten weisen auf die essentielle Rolle von IL-35 als suppressives Treg-Zytokin hin. Defekte in den Genen für die beiden IL-35-Untereinheiten führten zu einer signifikant reduzierten inhibitorischen Aktivität von Treg-Zellen *in vivo* und *in vitro* (Collison et al., 2007). Im Gegenzug kam es nach Stimulation mit rekombinantem IL-35 zu einer verminderten T-Zell-Proliferation *in vitro* (Niedbala et al., 2007). Ein anderer Suppressionsmechanismus beruht auf der Fähigkeit von Treg-Zellen, Granzyme zu exprimieren, die eine zielgerichtete Zytolyse ermöglichen (McHugh et al., 2002; Grossman et al., 2004; Herman et al., 2004). Über die metabolische Beeinflussung der Reifung bzw. Funktion dendritischer Zellen können Regulatoren ebenfalls immunmodulatorisch wirken. Die Suppression wird hierbei über direkten Kontakt zwischen Antigen-

präsentierender Zelle und Treg-Zelle durch Herunterregulation der Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80 bzw. CD86 vermittelt (Cederbom et al., 2000). In wieweit neben der Freisetzung inhibitorischer Zytokine auch ein direkter Kontakt zwischen Treg- und Effektor-T-Zellen zu einer effektiven Hemmung beiträgt, ist derzeit Gegenstand der Forschung.

2.3.3.1 nTreg- und iTreg-Zellen

Hauptsächlich aufgrund ihrer stabilen bzw. transienten FoxP3-Expression werden Regulatoren in die natürlich vorkommenden Tregs (nTreg) und die induzierbaren oder adaptiven Tregs (iTreg) unterschieden (Bluestone und Abbas, 2003). Die absolute Abgrenzung beider Populationen, inwieweit die induzierbaren Regulatoren aus den natürlichen Tregs hervorgehen und welchen Beitrag beide Untergruppen für eine effektive Suppression leisten, ist bis heute nur zum Teil aufgeklärt. Die natürlich vorkommenden FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen werden im Thymus gebildet. Sie sind im Vergleich zu den meisten im Thymus produzierten naiven T-Zellen bereits funktionell gereift (d.h. kompetent Autoimmunität zu verhindern) und Antigen-spezifisch geprägt, bevor es zum peripheren Antigen-Kontakt kommt (Itoh et al., 1999). Untersuchungen mit MHC I- und II-defizienten Mäusen untermauern, dass FoxP3⁺ Thymozyten bzw. deren Vorläufer der positiv/negativ-Selektion im Thymus ausgesetzt sind (Fontenot et al., 2005). Teilweise wurden selbstreaktive T-Zellen als Ursprung natürlich vorkommender Regulatoren identifiziert. Experimentell konnte mittels doppelt transgener Mäuse, die sowohl die α - und β -Kette des T-Zell-Rezeptors (TZR) als auch ein Peptidantigen in thymischen Stromazellen spezifisch exprimieren, belegt werden, dass T-Zellen mit hoch affinem TZR zu MHC/selbst-Peptid-Ligand-Komplexen während der positiv/negativ-Selektion zu CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ Tregs differenzieren (Jordan et al., 2001; van Santen et al., 2004).

Während die Entwicklung natürlicher Regulatoren unabhängig von IL-2 und TGF- β erfolgt (Marie et al., 2005; Zheng et al., 2007), ist für die Induktion und Stabilisierung der FoxP3-Expression in peripheren naiven T-Zellen, d.h. für die Ausprägung des typischen iTreg-Phänotyps, die Anwesenheit beider Zytokine unerlässlich (Kretschmer et al., 2005; Rubtsov und Rudensky, 2007) (Abb.5). Ohne entsprechende Zytokinstimulation sinkt die transiente FoxP3-Expression in iTreg-Zellen schnell ab (Zheng et al., 2007). Hingegen wird die Stabilität von FoxP3 in nTregs kontinuierlich durch die Prozesse der positiv/negativ-Selektion im Thymus aufrechterhalten. IL-6, das wie bereits beschrieben mit entscheidend für die Th17-Differenzierung ist, beeinflusst bzw. inhibiert in Abhängigkeit von TGF- β die Differenzierung naiver T-Zellen zu FoxP3⁺ Tregs (Bettelli et al., 2006, Veldhoen et al., 2006). In vitro induziert IL-6 in Abwesenheit exogener TGF- β -Stimulation die

Entwicklung natürlicher Regulatoren hin zum Th17-Phänotyp (Xu et al., 2007) und verringert deren suppressives Potenzial (Zheng et al., 2008). Im Gegensatz dazu können iTregs nach IL-6-Stimulation nicht zu Th17-Zellen konvertieren. Eine Aktivierung von nTregs mit IL-2 und TGF- β führt über die Modulation des IL-6-Signalweges zur Stabilisierung ihres inhibitorischen Phänotyps und verhindert die Konversion zu Th17-Zellen (Laurence et al., 2007; Zheng et al., 2008). Diese Ergebnisse verdeutlichen eindrucksvoll die Vernetzung der einzelnen Th-Zell-Populationen und zeigen gleichzeitig die Schwierigkeit einer exakten Untergliederung der Subgruppen *in vivo* unter Berücksichtigung eines sich ständig wechselnden Zytokinmilieus.

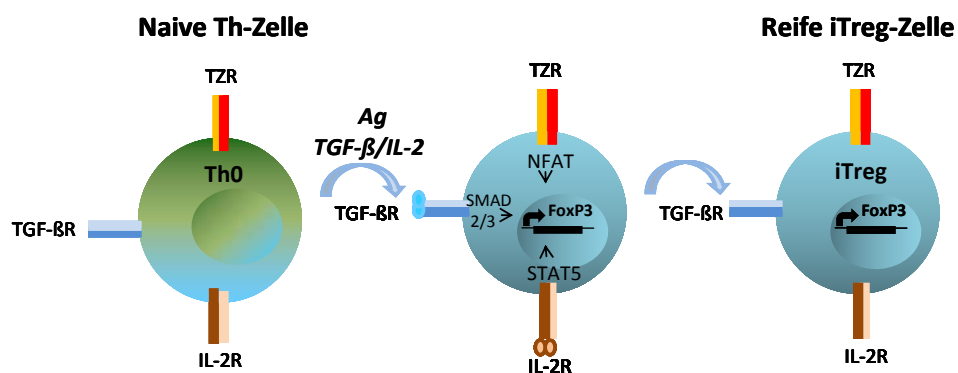


Abb.5 Differenzierungsschema der iTreg-Zellen. Details siehe Text

2.4 Die Bedeutung von CD4⁺ Th-Zellen und ihrer Zytokine in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen

Trotz bisher unvollständig aufgeklärter Ätiologie der RA konnten enorme Fortschritte bei der Identifikation zellulärer Mechanismen der Erkrankung erzielt werden. Wie in den vorhergehenden Abschnitten beschrieben, vermitteln T- und B-Zellen, Makrophagen, Neutrophile, synoviale Fibroblasten, Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten sowie deren assoziierte Zytokine die Entstehung der Gelenkentzündung und die Progression der RA. Die im synovialen Gewebe angereicherten, funktionell aktiven Zytokine wirken sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase und stimulieren über die Aktivierung entsprechender Zellen die Destruktion von Knorpel und Knochen oder aber auch deren Hemmung.

Im Gegensatz zur klar definierten Rolle von z.B. TNF- α ist die Bedeutung anderer T-Zell-Zytokine in der Pathogenese der RA weniger gut untersucht. Da man vor der Charakterisierung proinflammatorisch wirkender Th17-Zellen hauptsächlich autoreaktive Th-Zellen vom Th1-Phänotyp aus der Synovialmembran von RA-Patienten isolierte (Dolhain et al., 1996; Fritsch et al., 2002), ging man lange Zeit von einem Paradigma aus, das ein Ungleichgewicht der Th1/Th2-Balance bei der RA zu

Grunde legt. Zahlreiche Studien an Nagermodellen zeigten eine Th1-Zell-vermittelte Fehlorganisation, bei welcher die Th1-Antwort mit ihren proinflammatorischen Zytokinen IFN- γ und IL-2 über die protektiv wirkende Th2-Antwort dominiert. Sowohl chronische Entzündungen wie Morbus Crohn (Dieckgraefe et al., 2002) als auch Tiermodelle von Autoimmunerkrankungen wie die CIA (Kollagen induzierte Arthritis) und EAE wurden als Th1-vermittelte Krankheiten charakterisiert (Chalton et al., 1991). Für die CIA konstatierten Kageyama et al. (1998) bei IFN- γ -Rezeptor^{-/-} eine verringerte Häufigkeit und Schwere der Krankheit. Bei der Proteoglykan-induzierten Arthritis (PGIA) führte die Neutralisation von IFN- γ bzw. die Verwendung von IFN- γ knock-out Tieren sowohl zu einer verringerten initialen Schwere als auch zu einem milderen Krankheitsverlauf (Finnegan et al., 2002). Weitere intensive Studien mit IFN- γ - bzw. in IFN- γ -R-defizienten Mäusen in verschiedenen Krankheitsmodellen widerlegten jedoch weitgehend die Hypothese einer ausschließlich proinflammatorischen Wirkung von IFN- γ (Irmiler et al., 2007). Arbeiten von Manoury-Schwartz et al. (1997) beschrieben in der CIA eine verfrüht einsetzende Schwere der Krankheit bei IFN- γ -Mangel. Eine erhöhte EAE- Suszeptibilität sowie eine Verschlimmerung der Erkrankung wurde nach dem Fehlen von IFN- γ festgestellt (Ferber et al., 1996; Willenborg et al., 1999; Tran et al., 2000). Diese und weitere Untersuchungen führten letztendlich zur Erkenntnis, dass das typische Th1-Zytokin IFN- γ nicht exklusiv proinflammatorisch wirkt, sondern vielmehr eine immunmodulatorische Funktion übernimmt. Bereits 1988 wurde durch Gajewski et al. der inhibitorische Einfluss von IFN- γ auf die Proliferation IL-4-produzierender Th2-Zellen nachgewiesen. Erwähnenswert ist ebenfalls, dass IFN- γ selektiv zur Apoptoseinduktion aktivierter T-Zellen beitragen kann (Liu et al., 1990; Dalton et al., 2000; Refaeli et al., 2002) und in der Folge die Verschiebung Th-Zell-Balance in Richtung FoxP3⁺ Tregs einleiten kann (Wang et al., 2006). Weitere Arbeiten unterstreichen die Vorstellung einer modulatorischen Kompetenz der Th1-Zellen bzw. dem IFN- γ (Harrington et al., 2005; Cruz et al., 2006; Huehn et al., 2006; Kelchtermans et al., 2008).

Im Vergleich zu IFN- γ ist das von Th17-Zellen produzierte IL-17, vom heutigen Wissensstand ausgehend, ausschließlich als ein proinflammatorisches Zytokin anzusehen. Erhöhte IL-17-Spiegel wurden unter anderem bei Patienten mit RA (Chabaud et al., 1999), multipler Sklerose (Lock et al., 2002), inflammatorischen Darmkrankheiten (Fujino et al., 2004) sowie Psoriasis (Wilson et al., 2007) detektiert. Ursprünglich als Th1-vermittelt charakterisierte Modelle wie die CIA oder EAE (Chalton et al., 1995) zeigen sowohl in IFN- γ - als auch in IFN- γ -R-defizienten Mäusen einen deutlich progressiveren Krankheitsverlauf, der mit einer signifikant erhöhten IL-17-Produktion einhergeht (Cruz et al., 2006). Hingegen begünstigt ein Mangel an IL-17, hervorgerufen durch gezielte Mutation des IL-17-Gens oder durch IL-17-

Neutralisation mittels spezifischer Antikörper, ein mildere Progression der CIA (Nakae et al., 2003), der AIA (Marije et al., 2005; Lubberts et al., 2005; Irmeler et al., 2007) sowie der EAE (Komiyama et al., 2006).

Eine Bestätigung der immunregulatorischen Funktion von Th1-Zellen einerseits und der proinflammatorischen Wirkung der Th17-Population andererseits erfolgte durch die gezielte Modulation der IL-12-Zytokinfamilie (Murphy et al., 2003; McInnes et al., 2007), deren Mitglieder an der Entwicklung beider Th-Subklassen beteiligt sind. Ein Mangel des typischen Th1-Differenzierungszytokins IL-12, das aus den Untereinheiten p35 und p40 besteht und durch Mutation der IL-12p35-Untereinheit hervorgerufen wurde, erhöhte die Suszeptibilität für CIA und EAE. Indessen führte das für die Stabilisierung des Th17-Phänotyp essentielle IL-23, bestehend aus den Untereinheiten p19 und p40, in IL-12p40- bzw. IL12p19-defizienten Mäusen zu einer Resistenz gegen CIA und EAE (Becher et al., 2002; Cua et al., 2003). Interessanterweise entwickelten Kollagen Typ II-immunisierte IL-12p19^{-/-} Tiere, die eine signifikante Verschiebung ihrer Th-Balance in Richtung IFN- γ -produzierender Th1-Zellen zeigten, keine Arthritis. Aggarwal et al. (2003) detektierten eine verringerte IL-17-Sekretion bei einer Defizienz von IL-23. Hingegen trat beim Transfer Myelin-spezifischer CD4⁺ IL-17-Produzenten, die *in vitro* mit IL-23 vorbehandelt wurden, eine Verschlimmerung der EAE ein (Langrish et al., 2005). Diese Resultate untermauern die Notwendigkeit von IL-23 für die Th17-Entwicklung und bestätigen gleichzeitig das proinflammatorische Potenzial der Th17-Population.

Durch den pleiotropen Effekt von IL-17 werden neben T-Zellen auch Makrophagen, Fibroblasten sowie weitere synoviale Zellen beeinflusst. Dies führt zu einer Hochregulation von Chemokinen, Adhensionsmolekülen und proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , TNF und IL-6 (Jovanovic et al., 1998; Huang et al., 2004; Kolls et al., 2004). So stimulieren IL-23-aktivierte Th17-Zellen im Gegensatz zu Th1- und Th2-Zellen die Osteoklastendifferenzierung und steuern so einen Teil für die Knochendestruktion bei (Sato et al., 2006). Die Induktion der Osteoklastogenese über Th17-Zellen kann dabei direkt über Zell-Zell-Kontakt durch die Expression membranständiger Mediatoren (RANKL, CD40L) oder indirekt über die IL-17-vermittelte Stimulation durch Expression von RANKL auf Osteoklasten-Vorläufern oder FLS erfolgen (Kramer et al., 2007).

Wie bereits in den vorhergehenden Abschnitten erörtert, limitieren CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen die Expansion und Zytokinproduktion proinflammatorischer Effektor- sowie autoreaktiver T-Zellen und minimieren somit das Risiko der Entstehung eines immun-vermittelten pathologischen Geschehens (Shevach et al., 2006b). Zur funktionellen Charakterisierung von Regulatoren wird häufig die Antikörper-vermittelte Depletion CD25⁺ Zellen genutzt (Couper et al., 2007; McNeill et al., 2007) bzw. wurde durch Generierung entsprechend genetisch

modifizierter Tiere auch die Depletion FoxP3⁺ T-Zellen möglich (Kim et al., 2007; Lahl et al., 2007). Beide Methoden besitzen in der experimentellen Anwendung Vor- und Nachteile, da durch Verringerung oder des Wegfalls der regulatorischen Th-Subpopulation das immunologische Gleichgewicht erheblich gestört wird. Sowohl im Modell der CIA als auch der AIA kommt es durch die Depletion CD25⁺ Zellen vor Arthritisinduktion mittels entsprechender anti-CD25-Antikörper zu einer verstärkten Progression der Krankheit (Morgan et al., 2003; Frey et al., 2004). Neben dem schwereren klinischen Verlauf der Arthritis konnte ebenfalls eine erhöhte zelluläre und humorale Immunantwort in anti-CD25-behandelten Tieren detektiert werden. Im Gegenzug vermittelte der Transfer CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in Arthritismodellen eine immunsuppressive Wirkung (Morgan et al., 2005; Review Boissier et al., 2009). Ein Treg-Transfer vor bzw. zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion führte zu deutlich abgeschwächten klinischen Symptomen in der akuten und chronischen Phase der AIA. Dagegen scheint eine etablierte Arthritis von einem Transfer unbeeinflusst zu bleiben (Frey et al., 2005; Bayry et al., 2007).

Mit Hilfe der beschriebenen experimentellen Modelle, welche die komplexe Entwicklung von Autoimmunerkrankungen insbesondere der Arthritis zumindest partiell darstellen, konnten in den letzten Jahren weitere Th-Zell-Populationen und deren Zusammenspiel charakterisiert, neue Eigenschaften bereits bekannter Subtypen und deren assoziierter Zytokine wie z.B. IFN- γ aufgezeigt und nicht zuletzt eine ganze Reihe neuer immunregulatorischer und proinflammatorischer Zytokine, die eventuell zukünftiges therapeutisches Potenzial besitzen, identifiziert werden.

2.5 Zielstellung der Dissertation

Die Pathogenese der RA wird durch das Zusammenwirken verschiedenster Zelltypen und Stimuli vorangetrieben. Das Verständnis dieser komplexen Mechanismen ist eine grundlegende Voraussetzung für die Entwicklung effizienter, möglichst Nebeneffekt-freier Therapieansätze. Vor allem die durch Simulation des Krankheitsgeschehens im Tiermodell gewonnenen neuen Erkenntnisse ermöglichten eine detailliertere Betrachtungsweise bzw. Neuinterpretation bestehender Paradigmen.

Unsere Arbeitsgruppe konnte durch vorausgegangenen Studien im Modell der AIA zeigen, dass das Fehlen des häufig als exklusiv proinflammatorisch beschriebene Zytokin IFN- γ zu einer verstärkten IL-17-Freisetzung und darüber hinaus *in vivo* zu einem exazerbierten Arthritisverlauf führte (Irmeler et al., 2007). Die Rolle von IL-17 als potenziellen Entzündungsmediator konnte ebenfalls in anderen Arthritismodellen eindrucksvoll bestätigt werden (Nakae et al., 2003). Eine weitere Schlüsselfunktion, die den regulatorischen T-Zellen bei der Progression der AIA zugesprochen wird, konnte durch die Arbeiten von Frey et al. (2005) nachgewiesen werden. Die von

Schurigt et al (2008) durchgeführten Experimente über verschiedenartig expandierenden Zellen des Immunsystems ergaben zusätzliche Hinweise über die Mechanismen für bedingt ablaufende Destruktionsvorgänge in der AIA. Hierbei wurde festgestellt, dass aktivierte T-Zellen die Fähigkeit besitzen, unter anderem über die Sekretion von Zytokinen wie MIF (macrophage migration inhibitory factor) Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten zu transformieren und somit die Produktion Knorpelmatrix-verdauender Enzyme letztendlich zu stimulieren.

Aufbauend auf den beschriebenen Ergebnissen war das Ziel der vorliegenden Arbeit, das Zusammenwirken der Th-Zell-Zytokine IL-17 und IFN- γ während der AIA zu charakterisieren und den Einfluss dieser Interaktion auf die Progression und Schwere der Erkrankung zu untersuchen. Hierfür sollten zunächst klinische und immunologische Parameter bei einem Fehlen von IL-17 oder IFN- γ erfasst und verglichen werden sowie in beiden Fällen die Auswirkung einer Th-Zell-Depletion auf den Krankheitsverlauf verfolgt werden. Im Mittelpunkt der Experimente sollte in diesem Zusammenhang zum einen die detaillierte Detektion der Th17-Antwort stehen. Zum anderen sollte der Blick auf die Diskrepanz typischer regulatorischer T-Zellmarker bei IL-17- oder IFN- γ -Mangel fokussiert bzw. die Progression der Arthritis in Treg-depletierten IL-17^{-/-} Tieren beobachtet werden. Vor dem Hintergrund der gewonnenen Daten sollte die Klinik der AIA bei simultanem Mangel von IL-17 und IFN- γ erfasst sowie immunologisch interpretiert werden. Letztendlich sollten geeignete Kulturenansätze darüber Aufschluss geben, in welcher Art und Weise IL-17 oder IFN- γ bzw. beide Th-Zell-Zytokine gemeinsam die funktionellen Eigenschaften primärer Synoviozyten modulieren.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Brutschrank „Cellstar“

Digitalkamera „Canon Powershot G5“

Durchflusszytometer FACS Calibur™

ELISA-Reader „EAR 400 FT“

ELISA-Platten-Waschgerät „Columbus“

Feinwaage „MC1 Analytic Ac 210S“

Kryostat „HM 500M“

Kühlzentrifuge „Jouan CR312“

Laminarflowbox

Mehrkanalpipetten

Mikroskop „Jenamed“

RT-PCR-Cycler

Pipettierhilfe

Tischzentrifuge „Biofuge 13“

UV-Tisch „T2201“

Vortexgerät „VF2“

Wasserbad „JULABO U3“

Zählkammer „Fuchs-Rosenthal“ (Tiefe 0,2mm)

Nunc, Wiesbaden

Canon, Krefeld

Becton Dickinson, Heidelberg

SLT Laborinstruments,
Crailsheim

SLT Laborinstruments

Sartorius, Göttingen

Mikrom, Walldorf

Jouan, Unterhaching

Elektromat, Dresden

Eppendorf, Hamburg

Carl Zeiss, Jena

Bio-Rad-MyiQ, München

Eppendorf

Heraeus, Hanau

Sigam-Aldrich, Taufenkirchen

IKA-Labortechnik, Stauben i.
Bremen.

Julabo-Labortechnik,
Seelbach

FeinOptik, Bad Blankenburg

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Einmalfilter (0,45µm), steril, pyrogenfrei

Einmalspitzen (10, 100, 1000µl)

Einmalspritzen und – kanülen

Einmalstangenpipetten (verschied. Größen)

Gewebekulturschalen (250ml)

Kryoröhrchen, steril

Kulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-Well)

Mikrotiterplatten für Elisa

Polypropylen-(PP) Röhrchen (15ml, 50ml)

Schleicher & Schüll, Dassel

Eppendorf

Braun Melsungen, Melsungen

Greiner Bio-One, Fricken-
hausen

Greiner Bio-One

Greiner Bio-One

Greiner Bio-One

Greiner Bio-One

Greiner Bio-One

Real-Time-PCR Reaktionsgefäße (0,1ml)
 Reaktionsgefäße (Eppis) (verschied. Größen)
 Membran-Transwelleinsätze (12-Well; Ø 4µm)

LFT Labortechnik, Wasserburg
 Eppendorf
 Greiner Bio-One

3.1.3 Kit-Systeme

Absolutely RNATM Microprep Kit
 Super-ScriptTM II RNase H

Stratagene, Heidelberg
 Gibco Invitrogen, Karlsruhe

3.1.4 Chemikalien & Reagenzien

Bordetella pertussis (hitzeinaktiviert)
 BSA (Bovines Serum Albumin)
 1,9-Dimethylen Blau
 CDS Primer (Credit Default Swap)
 Dithiothreitol DTT (0,1M)
 Dulbecco`s modified Eagle`s Medium (DMEM)
 Dulbecco`s modified Eagle`s Medium/Mutmix F12
 Ether zu Narkose
 Fetales Kälberserum (FCS)
 Ficoll-Isopaque-Lösung
 Glutamin/Penicillin/Streptomycin
 Guanidinhydrochlorid
 Hämatoxylin
 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)
 -ethansulfonsäure (Hepes)
 HotStarTaq DNA-Polymerase
 Komplettes Freund`sches Adjuvanz (CFA)
 MgCl₂; 10xPCR-Puffer
 2-Mercaptoethanol
 Methyliertes Rinderserumalbumin (mBSA)
 Mycobacterium tuberculosis (H37RA)
 N-(1-Naphtyl) ethylendiamindihydrochlorid
 4-Nitrophenyl-phosphate-disodium-salt
 Ortho-Phenylendiamin (OPD)
 Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)
 Primer (Real-Time-PCR)
 Tuberculin Purified Protein Derivate (PPD)
 RPMI 1640 Medium

Chiron Behring, Marburg
 Sigma, Deisenhofen
 Serva, Heidelberg
 Metabion, Martinsried
 Gibco Invitrogen
 Gibco BRL, Gaithersburg, USA
 Gibco Invitrogen
 Hoechst, Farnkfurt/M.
 Gibco Invitrogen
 GE Healthcare, München
 Gibco Invitrogen
 Merck, Darmstadt
 Merck
 Gibco Invitrogen
 Quiagen, Hilden
 Sigma-Aldrich
 Quiagen, Hilden
 Gibco Invitrogen
 Sigma-Aldrich
 Difco, Detroit (USA)
 Fluka, Buchs
 Serva
 Sigma-Aldrich
 Sigma-Aldrich
 Metabion
 Statens Seruminstitut, Kopen-
 hagen
 Gibco Invitrogen

Streptavidin-Peroxidase	Dianova, Hamburg
SYBR Green I	Sigma-Aldrich
[3H]-Thymidin	Amersham, Braunschweig
Trypsin/EDTA	Biochrom, Schweiz
Tween20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaureat)	Sigam-Aldrich

3.1.5 Kulturmedium und Puffer

Medium für primäre Fibroblasten

DMEM supplementiert mit:
 FCS (hitzeinaktiviert) (20%; 3%)
 Streptomycin (0,1mg/ml)
 Penicillin G (100U/ml)
 L-Glutamin (2mM)
 Hepes (10mM)
 Natriumpyruvat (1mM)
 2-Mercaptoethanol (0,05mM)

Medium für Zellkultur

RPMI supplementiert mit:
 FCS (hitzeinaktiviert) (10%)
 Streptomycin (0,1mg/ml)
 Penicillin G (100U/ml)
 L-Glutamin (2mM)
 Hepes (10mM)
 Natriumpyruvat (1mM)
 2-Mercaptoethanol (0,05mM)

Puffer für den Kollagen-ELISA

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):

NaCl (0,8%); Na₂HPO₄ x 2H₂O (0,144%); KH₂PO₄ (0,02%); KCL (0,02%) in 1l Aqua dest. lösen und mit NaHCO₃ auf pH 7,4 einstellen

Beladungspuffer:

NaHCO₃ (0,1M); pH 9,5 [NaHCO₃(0,84g) in 100ml Aqua dest. lösen]

Waschpuffer: Tween 20 (0,05%); BSA (1%) gelöst in PBS

Probenpuffer: 1% BSA mit PBS/Tween20 0,05%

Bikarbonatpuffer: NaHCO₃ (0,1M, pH 9,5)

Anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat:

Anti-Maus-IgG-Peroxidase ("Dianova" 0,2µl/ml); Tween 20 (0,05%); BSA (1%) gelöst in PBS

Substratlösung für Peroxidase:

ortho-Phenylendiamin (OPD) (2mg/ml); Natriumzitratpuffer (0,1M); pH 4,8
gelöst und filtriert; vor dem Auftragen wurde 3%ige H₂O₂-Lösung(25µl/ml)
zugegeben

Stopplösung für Peroxidase: 2N H₂SO₄**Puffer für den Zytokin-ELISA*****Beladungspuffer:***

Na-Phosphatpuffer: 0,1M Na₂HPO₄ x 2H₂O; 100ml Aqua dest. (pH 9,0)

Na-Carbonatpuffer: 0,1M NaHCO₃; 100ml Aqua dest. (pH 9,5)

Blockierungspuffer: 2% BSA in PBS***Waschpuffer: 50µl Tween20 in 100ml PBS******OPD-Substratlösung: 2mg/ml OPD in 100mM Zitratpuffer; pH 4,8; 3% H₂O₂*****Erythrozyten-Lyse**

0,8% NH₄Cl/Tris-Lösung/ steril

Lysepuffer für Genotypisierung

100mM Tris-HCl pH8,5
5mM EDTA (Na₂)
0,2% SDS
200mM NaCl

Pufferzusätze zur Zelllyse für WB

10mM EGTA
1mM Dithiothreitol (DTT)
1mM Phenylmethylsulfonylfluorid
20µg/ml Leupeptin
6µg/ml Pepstatin A

Inkubationspuffer für Zymographie

100mM Tris-HCl pH7,8
30mM CaCl₂
0,02% Natriumazid

Antikörper für FACS

Tab.2 Antikörper für FACS-Analysen

Antikörper	Markierung	Klon	Isotyp	Herkunft
anti-CD3	PE	145-2C11	Ham IgG	eBioscience
anti-CD4	PerCP	RM4-5	Rat IgG2a,k	BD Pharmingen
anti-CD8	APC	53-6.7	Rat IgG2a,k	eBioscience
anti-CD25	APC	3C7	Rat IgG2b,k	BD Pharmingen

Antikörper	Markierung	Klon	Isotyp	Herkunft
anti-IFN- γ	PE	XMG1.2	Rat IgG1,k	BD Pharmingen
anti-IL-17A	PE	TC11-18H10	Rat IgG1	BD Pharmingen
anti-FoxP3	FITC	FJK-16	Rat IgG2a,k	eBioscience

Antikörper	Markierung	Klon	Isotyp	Herkunft
Isotyp	PerCP	R35-95	Rat IgG2a,k	BD Pharmingen
Isotyp	PE		Rat IgG1	BD Pharmingen
Isotyp	APC	A95-1	Rat IgG2b,k	BD Pharmingen
Isotyp	FITC		Rat IgG2a,k	eBioscience

3.1.6 Versuchstiere

Für die experimentellen Untersuchungen wurden folgende Mausstämme mit dem genetischen Hintergrund C57Bl/6 verwendet:

Wildtyp (C57Bl/6)	(Little et al., 1921)
IL-17^{-/-}	inaktiviertes Gen für IL-17 (Nakae et al., 2002)
IFN-γ^{-/-}	inaktiviertes Gen für IFN- γ (Dalton et al., 1993)
IL-17^{-/-} IFN-γ^{-/-}	inaktivierte Gene für IL-17 und IFN- γ

Die Zuchttiere für den IFN- γ ^{-/-} Stamm wurden von Prof. Dr. Edgar Schmitt (Johannes Gutenberg-Universität, Mainz) und für den IL-17^{-/-} Stamm von Prof. Dr. Gottfried Alber (Universität Leipzig) bzw. von Prof. Dr. Yoichiro Iwakura (University of Tokyo, Japan) zur Verfügung gestellt. Die weitere Zucht und Haltung der Tiere erfolgte am

Institut für Versuchstierkunde der FSU Jena. Die IL-17^{-/-} IFN- γ ^{-/-} Mäuse wurden am Institut für Pathologie gezüchtet. Während der Experimente erfolgte die Haltung der Mäuse im Tierhaus am Institut für Pathologie in kleinen Gruppen unter Standardbedingungen (12h/12h Hell-Dunkel-Rhythmus) sowie unter regelmäßiger Fütterung mit Standardnahrung (Altromin-Pellets # 1326) und Wasser ad libitum. Für die Studien wurden nur weibliche Tiere im Alter zwischen 8-10 Wochen eingesetzt. Die Tierversuche und das Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen waren durch das Thüringer Landesverwaltungsamt genehmigt.

3.1.6.1 Züchtung der IL-17-/IFN- γ -defizienten Maus

Für die Züchtung der IL-17-/IFN- γ -defizienten Maus stand sowohl die homozygote IL-17- als auch die IFN- γ -knock out Maus zur Verfügung (Nakae et al. 2002; Dalton et al. 1993). Beide Mausstämme wurden über mehrere Generationen miteinander verpaart. Die Nachkommen wurden biotipiert und mittels PCR genotypisiert. Hierfür wurden neben Primern für das IL-17- und IFN- γ -Gen ebenfalls GFP (grün-fluoreszierende Protein)- und Neomycin-Resistenz-spezifische Primer verwendet. Konstrukte mit den entsprechenden Sequenzen kamen bei der Generierung der IL-17- bzw. IFN- γ -defizienten Maus zum Einsatz (Tab.3).

Tab.3 PCR-Primer für Genotypisierung

Gen	„Forward Primer“	„Reverse Primer“	PCR-Produkt-Größe
IL-17	5'-ACT CTT CAT CCA CCT CAC ACG A-3'	5'-CAG CAT CAG AGA CTA GAA GGG A-3'	1,3kb
IFN- γ	5'-CTC AAG TGG CAT AGA TGT GGA-3'	5'-CGT CTC ACC TCA AAC TTG GC-3'	342bp
GFP	5'-ACA AGT TCA GCG TGT CCG GC-3'	5'-TTG TGG CTG TTG TAG TTG TAC TCC AG-3'	382bp
Neo	5'-CTG GGC ACA ACA GAC AAT CGG CTG-3'	5'-GTC CAG ATC ATC CTG ATC GAC AAG-3'	408bp

3.1.6.2 Biopsieentnahme und Isolierung genomischer DNA

Für die Gewinnung von Biopsien wurden die Tiere mit Ether narkotisiert und mit einer sterilen Schere ein kleines Stück der Schwanzspitze entnommen. Die Proben wurden dann in Lysispuffer mit Proteinase K (Promega) über Nacht bei 55°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach Inaktivierung der Proteinase K bei 95°C für 10min wurden die abgekühlten Proben für 15min bei 13.000rpm zentrifugiert und der Überstand in

ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die Fällung der DNA wurde der Überstand mit 0,7 Volumeneinheiten Isopropanol versetzt, vorsichtig geschüttelt und 30min bei Raumtemperatur (RT) und 13.000rpm zentrifugiert. Das mit 70% Ethanol gewaschene DNA-Pellet wurde in 40µl sterilem destillierten Wasser (Braun) aufgenommen und für die spätere Genotypisierung bei -20°C gelagert.

3.2 Methoden

Für die Charakterisierung der AIA wurden sowohl die Zytokin-defizienten Mäuse als auch die mit Antikörper behandelten Tiere 3 Tage nach der Arthritisinduktion (Tag 3) untersucht. Jede Studie wurde mindestens einmal wiederholt.

3.2.1 Immunisierung und Arthritisinduktion

Vor der Arthritisinduktion am Tag 0 wurden die Versuchstiere zweimal immunisiert. Die erste Immunisierung erfolgte am Tag -21 subkutan in die rechte Flanke. 7 Tage später (Tag -14) erfolgte die zweite Immunisierung dorsal in die Schwanzwurzel („Boosterung“). Zur Herstellung der hierbei verwendeten Suspension wurden 10mg methyliertes Rinderserumalbumin (mBSA; 2mg/ml) in 5ml kalter physiologischer Kochsalzlösung gelöst und steril filtriert (0,45µm Filter). Anschließend wurde ein Volumen mBSA-Lösung mit einem Volumen komplettem Freund'schen Adjuvanz (CFA) emulgiert, so dass die Endkonzentration des Antigen für die Injektion 1mg/ml betrug. Zur CFA-Herstellung wurde inkomplettes Freund'sches Adjuvanz mit 2mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA; DIFCO) supplementiert. An den Tagen -21 und -14 wurden pro Tier 100µl des Antigen-Adjuvanz (entspricht 100µg mBSA) injiziert. Zur Verstärkung der Immunantwort erhielten die Tiere zu den gleichen Zeitpunkten intraperitoneal 5×10^8 hitzeinaktivierte *Bordetella pertussis*-Keime. Unter Ether-Narkose erfolgte am Tag 0 das Auslösen der Arthritis durch Injektion von 25µl (100µg) einer sterilen mBSA-Lösung (4mg/ml) in das rechte Kniegelenk (Abb.6).

Bei früheren Untersuchungen in unserem Labor erzeugte die Injektion physiologischer Kochsalzlösung (Negativkontrolle) in das kontralaterale Kniegelenk keinerlei Entzündungsreaktionen. Aus diesem Grund wurde bei den vorliegenden Experimenten auf diese Kontrollinjektion verzichtet.

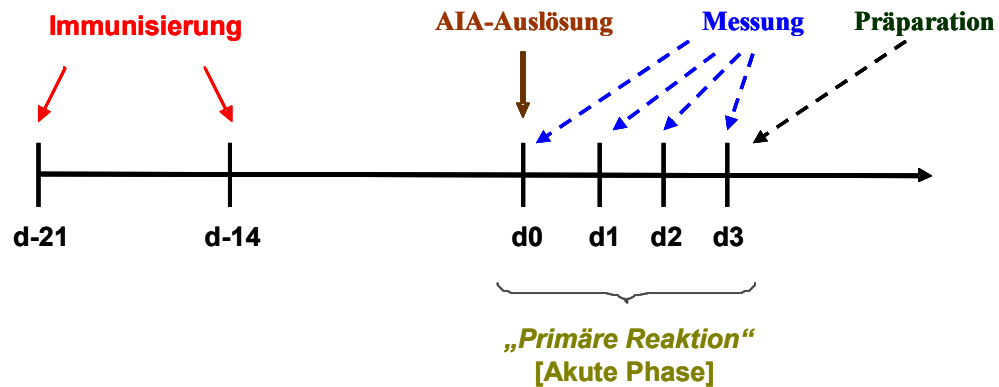


Abb.6 Modell der Antigen-induzierten Arthritis (AIA) Das Immunisierungsschema zur Erzeugung der Arthritis umfasst eine zweimalige Immunisierung am Tag -21 subkutan und am Tag -14 in die Schwanzwurzel. Zwei Wochen später am Tag 0 erfolgt das Auslösen der Arthritis im rechten Kniegelenk.

3.2.2 Behandlung der Versuchstiere mit verschiedenen Antikörpern

Alle Antikörper wurden mittels FPLC aus Hybridomkulturüberständen aufgereinigt, welche in regelmäßigen Zeitabständen auf Mycoplasmen getestet wurden. Zur Depletion $CD25^+$ und $CD4^+$ Zellen wurden der anti- $CD25$ -Ak Klon PC61.53 (gerichtet gegen ein Epitop der α -Kette des IL-2R) bzw. der anti- $CD4$ -Ak Klon GK1.5 (gerichtet gegen das Epitop L3T4a) verwendet. Zur Neutralisierung von $IFN-\gamma$ kam der anti- $IFN-\gamma$ -Ak Klon R4-6A2 zum Einsatz. Die Antikörper wurden den Mäusen intraperitoneal (ip) injiziert. Sowohl der anti- $CD25$ -Ak als auch der anti- $IFN-\gamma$ -Ak wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten vor bzw. während der Immunisierungsphase appliziert. Die erste und zweite Gabe fand jeweils drei Tage vor der ersten (Tag -24) bzw. zweiten Immunisierung (Tag -17) statt, während die letzte Injektion vor dem Auslösen (anti- $CD25$: Tag -12; anti- $IFN-\gamma$: Tag -7) der Arthritis erfolgte (Abb.7). Für die $CD4$ -Depletion wurde der entsprechende Ak zweimal an den Tagen -7 und -3 verabreicht (Abb.7). Die Kontrolltiere wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten mit normalem Ratten-Immunglobulin behandelt.

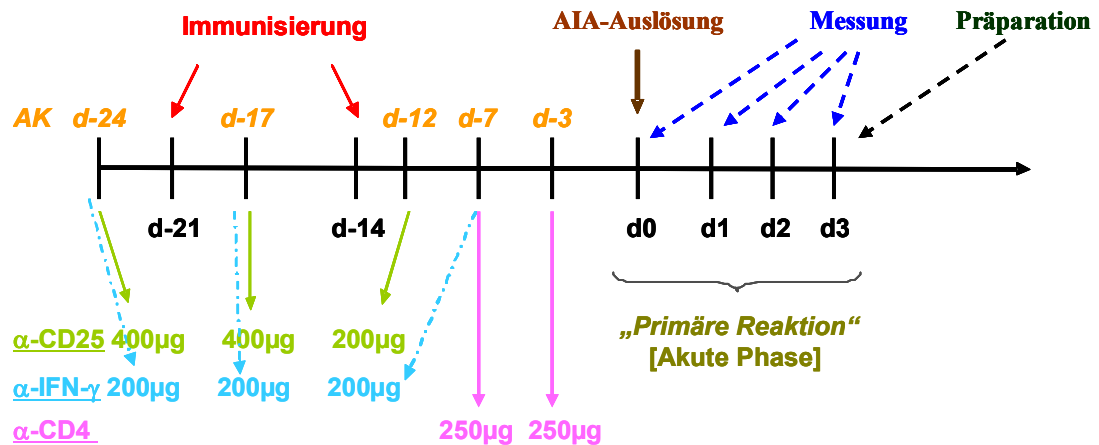


Abb.7 Schema der Antikörperinjektionen. Die Applikation von anti-CD25-Ak (α -CD25) (Tag: -24; -17; -12) und anti-IFN- γ -Ak (α -IFN- γ) (Tag: -24; -17; -7) erfolgte im Zeitraum der Immunisierungen sowie vor dem Auslösen der AIA intraperitoneal (ip). Der anti-CD4-Ak (α -CD4) wurde zweimal (Tage: -7; -3) vor Arthritisinduktion ip injiziert. Die Kontrolltiere bekamen zum selben Zeitpunkten normales Ratten-IgG.

3.2.3 Klinische Parameter der AIA

Messung der Kniegelenkschwellung

Bei der Bestimmung der Gelenkschwellung wurde jeweils das arthritisinduzierte Knie gemessen. Dazu wurden die Mäuse mit Ether betäubt und mit Hilfe eines Oditest-Schnelltasters der laterale Kniegelenkdurchmesser gemessen. Die Messung erfolgte am Tag 0 vor dem Auslösen der AIA sowie an den Tagen 1, 2 und 3 nach der Arthritisinduktion. Damit eine künstliche Reduktion der Kniegelenkschwellung durch den Schnelltaster vermieden wurde, musste zügig und ohne Druckanwendung gearbeitet werden. Die Differenz zwischen dem arthritischen Knie und dem nicht-arthritischen Knie (Tag 0 vor Auslösung) (dx-d0) wurde als Schwellung angegeben.



Abb.8 Messung des Kniegelenk-Durchmessers

3.2.4 Histologie

Nach dem Entbluten und Abtöten der narkotisierten Tiere wurden die rechten Kniegelenke entnommen, von anhaftenden Hautresten befreit und in gepuffertem Formalin (4,5%) fixiert. Das Ganze erfolgte für mindestens 24h bei Raumtemperatur. Weitere 24h wurde mit Aluminiumchlorid ($\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) entkalkt, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und die Kniegelenke anschließend in Paraffin eingebettet. Es wurden drei bis vier frontale Sektionen ($3\mu\text{m}$) des gesamten Gelenks angefertigt. Für die mikroskopische Beurteilung wurden die Schnitte anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Gelenkschnitte wurden vom Pathologen ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit bzw. der vorgenommenen Experimente bewertet. Dabei erfolgte die Beurteilung nach definierten Kriterien. Die Parameter waren: die akute Entzündung, die Hyperplasie der Synovialmembran und das zelluläre Infiltrat sowie die Veränderung der chronischen Gelenkentzündung und –destruktion, Knorpelnekrosen und die Pannusbildung (Tab.4). Waren im Kniegelenk keine pathologischen Befunde sichtbar, wurde der Wert Null vergeben. Die Summe der Punktzahlen der histopathologischen Veränderungen von Hyperplasie, zellulärem Infiltrat, Knorpelnekrosen und Pannus bildeten den Gesamtarthritiscore.

Tab.4 Bewertungsschema der Kniegelenke

Akute Entzündung	Punkte
Exsudat im Gelenkspalt:	
einzelne Granulozyten	1
fleckförmiges Granulozytenexsudat	2
massives Granulozytenexsudat	3
granulozytäre Infiltration der Synovialmembran:	
einzelne Granulozyten	1
kleinherdig oder diffus mäßig	2
mittelgradig bis dicht	3
Fibrin deutlich nachweisbar	+1
periartikuläres Gewebe mitbetroffen	+1
Chronische Entzündung	
synoviale Hyperplasie:	
gering, keine Aktivierung der synovialen Deckzellen/ keine Hyperplasie nur Aktivierung	1
>fleckförmig, mit Aktivierung der synovialen Deckzellen	2
deutliche Hyperplasie	3
mononukleäre Infiltration der Synovialmembran:	
überwiegend schütter	1
überwiegend mäßig	2
überwiegend dicht	3
periartikuläre Strukturen (Fibrose/Infiltration):	
geringe Fibrose/ Infiltration	1
mäßige Fibrose/ Infiltration	2
stark fibrös verbreitert/dichte Entzündungsinfiltration	3

<i>Destruktion Knorpel/ Knochen</i>	
minimale Gewebsdefekte/ Gruppennekrose von Chondrozyten	1
kleinere Defekte/ flächenhafte Chondrozytennekrosen	2
größere Defekte (>10%) einer Gelenkfläche/multiple kleine Defekte	3
massiver Defekt (>50%) einer Gelenkfläche/mehrere große Defekte	4

3.2.5 Bestimmung matrixspezifischer Antikörper

Serumgewinnung

Die Tiere wurden vor dem Entbluten mit Ether narkotisiert. Das Blut wurde nach Durchtrennen der Arteria carotis communis gewonnen und in einem sterilen Reaktionsgefäß aufgefangen. Anschließend erfolgte die zervikale Dislokation der Mäuse. Das Blut wurde dann für 10min bei 5000rpm zentrifugiert. Das Serum wurde vorsichtig abgenommen, in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Bestimmung der Antikörper gegen Kollagen Typ I (KI), Kollagen Typ II (KII) und Proteoglykane (PG) erfolgte mittels ELISA-Technik. Die hochbindenden ELISA-Platten wurden zuerst mit dem jeweiligen Antigen (KI; KII; PG; 10µg/ml; 50µl) in Bikarbonatpuffer bei 4°C über Nacht beladen. Anschließend wurden die Platten jeweils dreimal mit PBS/0,05% Tween20 gewaschen und mit 2% BSA für 2h (RT) geblockt. Nach erneutem Waschen erfolgte die Beladung der Platten mit den zu testenden Seren in einer entsprechenden Verdünnung (1:100 bis 1:500; in 1xPBS). Die Proben wurden in Duplikaten angefertigt. Nach der Inkubation bei 4°C über Nacht wurden die Platten dreimal mit PBS/0,05% Tween20 gewaschen und mit anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Platten erfolgte für die anschließende Farbreaktion die Zugabe der Substratlösung mit 0,2% o-Phenylendiamin (OPD). Bis zum Eintreten der Farb-reaktion wurden die ELISA-Platten im Dunkeln aufbewahrt und im Anschluss daran die Reaktion durch Zugabe von 100µl 2N H₂SO₄ pro Well gestoppt. Die Messung der optischen Dichte der jeweiligen Platten wurde im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 492nm gegen den Referenzfilter von 620nm gemessen.

3.2.6 Bestimmung der Zytokine sowie der Proliferationsrate

Um Aufschluss über die möglichen Ursachen des unterschiedlichen AIA-Verlaufs bei knock out bzw. Antikörper-behandelten Tieren zu erhalten, wurden die Zytokine in den Überständen Antigen- bzw. anti-CD3/CD28-stimulierter Lymphknoten- und Milz-Zellsuspensionen sowie die Proliferationsrate dieser Zellen gemessen.

Gewinnung und Kultivierung von Zellen aus Lymphknoten (LK) und Milzen

Nach dem Entbluten und der zervikalen Dislokation wurde die Bauchhöhle der Maus geöffnet. Es folgte die sterile Entnahme der LK (popliteal, inguinal, subaortal) sowie der Milz. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die einzelnen Organe jedes Tieres in RPMI-Medium mit 10% FCS aufbewahrt. Sowohl die LK als auch die Milz wurden getrennt in einer Petrischale (mit 1,5ml Medium) vorsichtig mit einer sterilen Pinzette zerkleinert. Die vorliegende Zellsuspension wurde durch zweimaliges Waschen mit Medium gereinigt (Zentrifugation: 6min, 1200rpm) und die Zellpellets dann in komplettem RPMI aufgenommen. Für die Gewinnung der Milzzellen war ein zusätzlicher Schritt zur Entfernung der Erythrozyten notwendig. Die Lyse der Erythrozyten erfolgte mit Ammoniumchlorid-Trislösung (2x 5ml pro Milz). Nach einminütiger Inkubation wurde zentrifugiert und anschließend erneut mit Medium gewaschen. Die gewonnen Zellsuspensionen wurden mit Trypanblau-Lösung verdünnt, in der Neubauerkammer gezählt und auf 1×10^7 Zellen/ml in komplettem RPMI-Medium eingestellt. Für die weiteren Experimente wurden 1×10^6 Zellen pro Well einer 12-Well-Kulturplatte eingesät. Die Platten wurden für 42 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank mit Antigen (mBSA (50µg/ml) bzw. PPD (25µg/ml)) oder über direkte polyklonale TZR-Aktivierung (anti-CD3/CD28 (2µg/ml)) stimuliert. Für die direkte Stimulation des TZR wurden die Platten vor Zugabe der Zellen mit anti-CD3/CD28 Antikörper (in PBS, 2h, im Brutschrank) beschichtet. Nach Ablauf der Stimulation erfolgte die Abnahme der Zellsuspension. Nach Zentrifugation (10min, 4500rpm, 4°C) wurde der zellfreie Überstand zur späteren Zytokinbestimmung auf Eis aliquotiert (450µl pro Reaktionsgefäß) sowie das mit PBS gewaschene Zellpellet für Western Blot- und RT-PCR-Analysen bei -70°C eingefroren.

Zytokinbestimmung

Mit Hilfe der ELISA-Technik wurden die Zytokine in Zellkulturüberständen gemessen. Für die Zytokinbestimmung wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit dem entsprechenden unmarkierten Antikörper beladen und über Nacht bei 4°C inkubiert (Tab.5). Am nächsten Tag folgte nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,05% Tween20 das Auftragen der Proben und Standards in der jeweiligen Verdünnungs-

stufe (Tab.6). Nach Inkubation bei 4°C über Nacht und dreimaligem Spülen erfolgte die Zugabe des entsprechenden Biotin-makierten AK (Tab.7). Die Platten wurden für zwei Stunden bei RT inkubiert und im Anschluss an die Spülphase mit 100µl/Well Streptavidin-gekoppelter Peroxidase-Lösung unter einer feuchten Atmosphäre versetzt (RT, 40min). Überschüssiges Konjugat wurde durch erneutes Waschen entfernt. Für die Farbreaktion wurden 100µl/Well OPD-Substratlösung zugegeben. Nach der Entwicklung einer konzentrationsabhängigen Farbintensität der Standardverdünnungsreihe (im Dunkeln) wurde die Reaktion durch Zugabe von 100µl/Well 2N H₂SO₄ abgestoppt und die Platten anschließend im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 492nm gegen den Referenzfilter von 620nm gemessen. Basierend auf den bekannten Konzentrationen der Standardverdünnungen und den ermittelten Extinktionen konnte mittels Regression die Zytokinkonzentration der einzelnen Zellkulturüberstände berechnet werden. Alle Proben und Standardverdünnungen wurden in Doppelbestimmungen ermittelt.

Tab.5 Antikörper zum Beladen für die Zytokin-ELISA

<i>Antikörper</i>	<i>Klon</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Hersteller</i>
rat-anti-mouse IL-2	JES6-1A12	1µg/ml (Na ₂ HPO ₄)	BD Pharmingen
rat-anti-mouse IL-4	BVD4-1D11	1µg/ml (Na ₂ HPO ₄)	BD Pharmingen
rat-anti-mouse IL-5	TRFK5	1µg/ml (NaHCO ₃)	BD Pharmingen
rat-anti-mouse IL-6	MP5-20F3	1µg/ml (NaHCO ₃)	BD Pharmingen
rat-anti-mouse IL-10	JES5-2A5	6µg/ml (Na ₂ HPO ₄)	BD Pharmingen
rat-anti-mouse IL-17	50101	2µg/ml (PBS)	R&D Systems
goat-anti-mouse IL-21		0,4µg/ml (PBS)	R&D Systems
rat-anti-mouse IFN-γ	R4-6A2	1µg/ml (Na ₂ HPO ₄)	BD Pharmingen
rat-anti-mouse TGF-β1	A75-2	2µg/ml (Na ₂ HPO ₄)	BD Pharmingen
goat-anti-mouse RANKL		0,4µg/ml (PBS)	R&D Systems
rat-anti-mouse OPG	110511	2µg/ml (PBS)	R&D Systems

Tab.6 Standards für die Zytokin-ELISA

<i>Standard</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Hersteller</i>
rec. murine IL-2	2000pg/ml	BD Pharmingen
rec. murine IL-4	10000pg/ml	BD Pharmingen
rec. murine IL-5	5000pg/ml	BD Pharmingen
rec. murine IL-6	5000pg/ml	BD Pharmingen
rec. murine IL-10	4000pg/ml	BD Pharmingen
rec. murine IL-17	10000pg/ml	R&D Systems
rec. murine IL-21	4000pg/ml	R&D Systems
rec. murine IFN-γ	10000pg/ml	BD Pharmingen
rec. murine TGF-β1	4000pg/ml	BD Pharmingen
rec. murine RANKL	4000pg/ml	R&D Systems
rec. murine OPG	4000pg/ml	R&D Systems

Der Standard wurde, ausgehend von den angegebenen Konzentrationen, über mind. 8 Stufen (1:2) verdünnt.

Tab.7 Detektoren für die Zytokin-ELISA

Detektor	Klon	Konzentration	Hersteller
Biotin-rat-anti-mouse IL-2	JES6-5H4	0,5µg/ml	BD Pharmingen
Biotin-rat-anti-mouse IL-4	BVD6-24G2	0,125µg/ml	BD Pharmingen
Biotin-rat-anti-mouse IL-5	TRFK4	0,25µg /ml	BD Pharmingen
Biotin-rat-anti-mouse IL-6	MP5-32C11	0,25µg/ml	BD Pharmingen
Biotin-rat-anti-mouse IL-10	JES5-16E3	0,5µg/ml	BD Pharmingen
Biotin-goat-anti-mouse IL-17		100ng/ml	R&D Systems
Biotin-goat-anti-mouse IL-21		100ng /ml	R&D Systems
Biotin-rat-anti-mouse IFN- γ	XMG1.2	0,5µg/ml	BD Pharmingen
Biotin-rat-anti-mouse TGF- β 1	A75-3	1µg/ml	BD Pharmingen
Biotin-goat-anti-mouse RANKL		0,2µg/ml	R&D Systems
Biotin-goat-anti-mouse OPG		0,2µg /ml	R&D Systems

Die Detektoren wurden in 1%BSA in PBS/ Tween20 verdünnt.

Proliferationsassay

Durch Stimulation mit Antigen oder direkte Aktivierung des CD3-Komplexes des TZR über entsprechende Antikörper können Th-Zellen zur Expansion angeregt werden. Mit Hilfe des Proliferationsassays wird der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die neu synthetisierte DNA als notwendige Voraussetzung für die Zellteilung gemessen. Die aus den Lymphknoten und Milzen gewonnene Zell-suspension wurde in 96-Well-Gewebekulturplatten (2x10⁵ Zellen/Well) eingesät. Das Gesamtvolumen pro Well betrug dabei inklusive Stimulation 200µl (in RPMI +10% FCS). Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ mit mBSA (50µg/ml), PPD (25µg/ml) oder anti-CD3/CD28 (2µg/ml) stimuliert. Nach 42h erfolgte die [³H]-Thymidin-Zugabe (10µl/Well, entspricht einer Aktivität von 0,5µCi/Well). Nach weiteren 18 Stunden Inkubation wurde das in die DNA eingebaute [³H]-Thymidin mittels Top-Counter gemessen.

3.2.7 Isolierung von Zellen über Microbeads

Für die Ko-Kultivierung von in vitro generierten Th17-Zellen und CD25⁺ Zellen erfolgte eine Zellseparation. Hierfür wurden jeweils aus 15 naiven Tieren die Milzen für eine Isolation CD4⁺CD62L⁺ bzw. aus 10 naiven Tieren die Milzen für die Isolation CD25⁺ Zellen entnommen. Für die Gewinnung der Einzelzellsuspensionen wurden die Milzen wie unter 3.2.6 beschrieben zerkleinert, die Erythrozyten lysiert und abschließend die Zellzahl bestimmt.

Die Isolierung der CD4⁺CD62L⁺ Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Miltenyi Biotec mit dem „Isolationskit II“ (130-091-751) bzw. mit dem „Miltenyi CD25 Micro Bead Kit“ (130-091-072) für CD25⁺ Zellen.

Generierung von Th17-Zellen

Für die Generierung von IL-17-produzierenden Th-Zellen wurden die frisch isolierten $CD4^+CD62L^+$ Zellen unter Zugabe von anti-IL-4 (10µg/ml), anti-IFN- γ (10µg/ml), IL-6 (30ng/ml), IL-21 (25ng/ml), IL-23 (10ng/ml; 24h später) und TGF- β (5ng/ml) für sieben Tage in anti-CD3/CD28-beschichteten 6-Well-Platten (2×10^6 Zellen/ml) kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen, gezählt und auf eine Zahl von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt.

Kokultur von Th17- und CD25⁺ Zellen

Für die Kokultur wurden die über eine Woche generierten Th17-Zellen im Verhältnis 2:1 mit frisch isolierten CD25⁺ Zellen in einer anti-CD3/CD28-beschichteten 12-Well-Platte (2×10^6 Th17-Zellen/Well) bzw. 96-Well-Platte (Proliferationsassay; 2×10^5 Th17-Zellen/Well) inkubiert. Die CD25⁺ Zellen wurden dabei direkt auf die Th17-Zellen gegeben und für 48h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Als Kontrollen dienten separat mitgeführte Th17- bzw. CD25⁺ Zellen. Nach der Kultivierung wurden die Zellen und Überstände aus den Platten entnommen, zentrifugiert und für weitere Analysen (ELISA und WB) bei -70°C aufbewahrt. Für die Bestimmung der Proliferationsrate erfolgte nach 42h die [³H]-Thymidin-Zugabe. Nach weiteren 18 Stunden Inkubation wurde das in die DNA eingebaute [³H]-Thymidin mittels Top-Counter gemessen.

3.2.8 Separation von Lymphozyten aus Augenblut

Isolierung von Augenblut

Die Gewinnung von Augenblut zwischen den einzelnen Immunisierungspunkten und im Verlauf der Arthritis erfolgte durch die Punktion des retrobulbären Venusplexus. Dafür wurde narkotisierten Mäusen eine sterile heparinisierte Glaskapillare nasal vom Bulbus in die Orbita eingeschoben. Zwischen Bulbus und hinterer Orbitaabgrenzung befinden sich die Äste des retrobulbären Venusplexus, die durch den leichten Druck der Glaspipette platzen. Das Blut kann dann durch das Glasröhrchen abfließen.

Lymphozytenseparation

Die Trennung der Lymphozyten und weiterer mononukleärer Zellen von den übrigen Blutbestandteilen erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Isopaque. Um eine Gerinnung zu verhindern, wurde das frisch gewonnene Augenblut sofort mit

einer Heparinlösung (Roche) im Verhältnis 1:1 gut gemischt. Für die weitere Auftrennung wurde das heparinisierte Blut 1:1 mit Hanks gepufferter Salzlösung (H-BSS; 20mM Hepes; Gibco) verdünnt. Die im entsprechenden Reaktionsgefäß vorgelegte Ficoll-Isopaque-Lösung (GE Healthcare) wurde mit dem verdünnten Blut überschichtet, ohne die beiden Phasen zu vermischen. Der so hergestellte Ficoll-Gradient wurde 45min bei 400xg (20°C) ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die separierte weißliche Bande mit den mononukleären Zellen (Lymphozytenschicht) vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit kalter H-BSS-Lösung gewaschen. Die isolierten Lymphozyten wurden für weitere Analysen bei -70°C aufbewahrt.

3.2.9 Fibroblastenaktivierung mit ex vivo stimulierten Milzzellen

Präparation primärer synovialer Fibroblasten (FLS)

Die Fibroblasten wurden aus Kniegelenken naiver, 8-10 Wochen alter C57Bl/6-Mäuse gewonnen. Dafür wurde unter sterilen Bedingungen die Patella aus dem Gelenk isoliert sowie das Binde- und Fettgewebe weitestgehend vom Gelenkknochen entfernt. Die Gelenkstücke wurden für 30min bei 37°C mit 0,1% Trypsin (Roche) unter starkem Schütteln angedaut. Danach wurden die Gelenkteile mit 10% DMEM sorgfältig gespült und in 0,1%iger Collagenase P-Lösung (Boehringer, Mannheim) für 2h bei 37°C geschüttelt, um die jeweiligen Gewebe- bzw. Zellbestandteile von den Gelenkköpfen zu lösen. Im Anschluss wurde die Zellsuspension mit 10% DMEM gewaschen und mit 20%igem DMEM in Kollagen-beschichteten 6-Well-Platten kultiviert.

Die Kultivierung erfolgte bei 37°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre. Nach 48h wurden die primären synovialen Fibroblasten vorsichtig mit PBS gewaschen, um Gewebereste abzuspülen, und es wurde ein Wechsel des Kulturmediums durchgeführt. Zur Entfernung unerwünschter Makrophagen wurden die Fibroblasten während der 14tägigen Kultivierung zweimal passagiert. Dazu wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und für 2-4 min bei 37°C mit 0,25% Trypsin (Gibco)/0,02% EDTA (Sigma) in PBS inkubiert. Die gelösten Zellen wurden in FCS-haltigem DMEM aufgenommen, zentrifugiert und in neue Kulturflaschen eingesät. Für die Kokultur wurden die Zellen 3-4x passagiert.

Präparation und Gewinnung von Milzzellsuspensionen

Um den Einfluss der verschiedenen T-Zell-spezifischen Zytokine auf die Aktivierung von FLS zu untersuchen, wurden Milzen aus C57Bl/6-Mäuse (arthritisch) isoliert und mit denen von IL-17-, IFN- γ -und IL-17/IFN- γ -defizienter Tiere am Tag 3 nach Arthritisinduktion verglichen. Unter sterilen Bedingungen wurden die Milzen präpariert und in RPMI (komplett) überführt. Für die weitere Bearbeitung und Gewinnung der Einzelzellsuspensionen wurden die Milzen wie unter 3.2.6 beschrieben zerkleinert, die Erythrozyten lysiert und abschließend die Zellzahl bestimmt.

Kokultur von synovialen Fibroblasten mit ex vivo stimulierten Milzzellen

FLS wurden mit der Milzzellsuspension in direktem Kontakt bzw. indirekt, unter Verwendung von Membran-Transwelleinsätzen (Porengröße 0,4 μ m), kokultiviert. Dafür wurden FLS aus naiven C57Bl/6-Mäusen isoliert. Die FLS (4x10⁵ Zellen pro Well) wurden drei Tage in 1ml DMEM (ohne Antibiotika (Ab)) mit 10% FCS bzw. 24h vor Zugabe der jeweiligen Milzzellsuspension in 1ml DMEM (ohne Ab) mit 1% FCS kultiviert. Vor dem Start der Kokultur wurden die Milzzellen für 18h mit mBSA (50 μ g/ml) bzw. mit anti-CD3/CD28 (2 μ g/ml) stimuliert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in 1ml DMEM und 3% FCS bei einer Dichte von 1,5x10⁶ Zellen/ml direkt bzw. indirekt mit 3x10⁶ Zellen/ml im Transwelleinsatz zu den adhären FLS gegeben (Abb.9). Die bereits mit mBSA stimulierten Zellen erhielten das Antigen auch während der Kokultur mit den FLS. mBSA-stimulierte sowie unstimulierte FLS dienten als Kontrollen. Die Abnahme der Zellkulturüberstände erfolgte beim direkten Kontakt nach 36h, beim Zellkontakt über Membran nach 48h. Nachfolgend wurden die sekretierten Zytokine mittels ELISA gemessen sowie die MMP-Aktivität über Zymographie bzw. MMP-Assay untersucht. Die FLS wurden mehrmals mit PBS gespült, um die Milzzellen zu entfernen und dann abtrypsinisiert. Aus den FLS wurde im Anschluss die Total-RNA isoliert (siehe 3.2.12) und für die spätere Bestimmung der Expression von MMPs und TIMPs bei -70°C eingefroren.

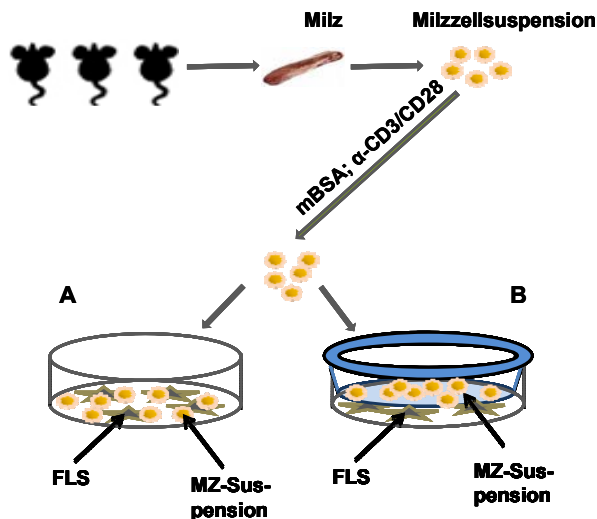


Abb.9 Synoviozytenaktivierung

Für die FLS-Aktivierung wurden Milzen aus WT C57Bl/6, IL-17-, IFN- γ - und IL-17/IFN- γ -defizienten Mäusen am Tag 3 der AIA präpariert, die Zellen isoliert und jeweils mit mBSA bzw. anti-CD3/CD28 stimuliert.

A: Kokultur von FLS mit stimulierten Milzzellen im direkten Zellkontakt. **B:** Kokultur bei indirektem Kontakt unter Verwendung von Membran-Transwelleinsätzen.

3.2.10 Zymographie

Mit der Methode der Zymographie erfolgte die Aktivitätsbestimmung von MMP-9 in den Überständen unterschiedlich stimulierter Fibroblasten-Kulturen. Diese Technik ermöglicht eine semiquantitative Aussage über den MMP-Gehalt in den jeweiligen Überständen, indem ein im SDS-Polyakrylamidgel einpolymerisiertes Protease-substrat durch MMP-9 spezifisch abgebaut wird. Als Proteasesubstrat wurde Gelatine (Merck Eurolab, Bruchsal) eingesetzt. Es erfolgte eine Natriumdodecylsulfat-Polyakrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli, bestehend aus einem Trenngel und einem Sammelgel (Tab.8). Vor dem Auftragen wurden die Proben 1:3 mit nicht-reduzierendem Probenpuffer verdünnt. Das Endvolumen pro Probenflasche betrug 80 μ l. Zusätzlich wurde ein humaner MMP-9-Standard (Novus Molecular Inc., San Diego, CA, USA) mitgeführt. Die Auftrennung im Gel erfolgte bei einer Stromstärke von konstant 15mA/Gel. Zur Entfernung von Natriumdodecylsulfat (hemmt die Enzymaktivität) wurde das Gel für 4 x 30min mit 2,5%-igem Triton X-100-haltigen Puffer (Ferak, Berlin) gewaschen. Nach kurzem Spülen mit H₂O erfolgte unter leichtem Schütteln die Inkubation für 24h bei 37°C mit Inkubationspuffer. Der Färbeporgang des Gels erfolgte für 45min mit Coomassie-Blau-Lösung. Anschließend wurde so lange entfärbt (25% Methanol, 7% Eisessig), bis enzymatisch aktive Bereiche als deutliche farblose Banden auf dem blau gefärbten Gel sichtbar wurden. Die Gele wurden anschließend mit dem FluorChem FC2 von Biozym dokumentiert.

Tab.8 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

	<i>Trenngel (Gelatine 10%)</i>	<i>Sammelgel</i>
Gel-Konzentration	7,5%	4,5%
Wasser (ml)	4,1	3,783
TGP (ml)	2,5	-
SGP (ml)	-	0,417
SDS 10% (ml)	0,1	0,05
Rotiphorese 30 (ml)	2,5	0,75
Gelatine 10g/l	1,0	-
APS 10% (µl)	40	40
TEMED (µl)	10	10

SDS und APS, Serva (Heidelberg); Rotiphorese, Carl Roth (Karlsruhe); TEMED, J.T. Baker (Phillipsburg, USA) [TGP= Trenngelpuffer; SGP= Sammelgelpuffer; SDS= Natriumdodecylsulfat; APS= Ammoniumpersulfat; TEMED= Tetramethyl-ethylendiamin]

3.2.11 MMP-Aktivitäts-Assay

Der MMP-Aktivitäts-Assay ist ein Fluoreszenz-Assay. Durch die Umsatzmessung von künstlichen Substraten kann indirekt eine Aussage über die MMP-Aktivität in den einzelnen Zellkulturüberständen getroffen werden. Nach der Anregung emittieren die künstlichen Substrate bei der Spaltung durch MMPs Licht mit einer spezifischen Wellenlänge. Die Fluoreszenzveränderung wurde mit dem Fluoreszenzreader „FluoStar-Galaxy“ (BMG, Offenburg) gemessen. Es wurden das Peptid 1, welches von verschiedenen MMPs umgesetzt werden kann und damit als Indiz für die MMP-Gesamtaktivität anzusehen ist, und das Peptid 2, welches bevorzugt von MMP-3 und minimal durch MMP-9 verstoffwechselt wird, verwendet.

Peptid 1: Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dap(Dnp)-Ala-Arg-NH₂

Peptid 2: Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Gly-Nva-Trp-Arg-Lys(Dnp)-NH₂
(Bachem, Heidelberg)

Peptid 1 und Peptid 2 werden durch MMPs mit unterschiedlichen katalytischen Geschwindigkeiten umgesetzt (Tab.9). Beim Assay wurden nur aktive und freie MMPs gemessen und nicht durch TIMPs inhibierte MMPs. Alle Proben wurden als Duplikate gemessen. Bei jeder Messung wurde zur Kontrolle Zellkulturmedium mitgeführt.

In speziellen schwarz-gefärbten Microlon-Mikrotiterplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) wurden 10µl Überstand des direkten Zellkontaktes bzw. 15µl Überstand des indirekten Kontaktes (Transwelleinsatz) mit Fluo-Reaktionspuffer (Gesamtvolumen 100µl/Well) pipettiert. Nachfolgend wurde 10µl APMA/Well (2mM) unter Vermeidung

von direkter Lichteinstrahlung zugegeben, der Platteninhalt gemischt und für 15min bei RT inkubiert. Der Start des Assays erfolgte durch Zugabe von Peptid 1 bzw. Peptid 2 (Endkonzentration 5µM). Die Platte wurde zur Messung umgehend in den Fluoreszenzreader eingesetzt. Bestimmt wird die Fluoreszenz des Substratumsatzes

Tab.9 Katalytische Umsatzgeschwindigkeiten [Kcat/KM (s-1M-1)] von Peptid 1 und Peptid 2.

Peptid	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-8	MMP-9	MMP-13
1	1,21-1,48 $\times 10^4$	6,29-51,6 $\times 10^5$	$2,3 \times 10^4$	$1,69 \times 10^5$	1,93-112,0 $\times 10^5$	4,42 $\times 10^6$	$7,57 \times 10^5$
2	nicht detektiert	nicht detektiert	$2,2 \times 10^5$	unbekannt	unbekannt	1,01 $\times 10^4$	unbekannt

Peptid 1 wird durch alle aufgeführten MMPs (MMP-1 bis MMP-13) umgesetzt, Peptid 2 hingegen nur durch MMP-3 und MMP-9. (Daten aus Knight et al., 1992; Knäuper et al., 1996; Fasciglione et al., 2000; Fields et al., 2000)

3.2.12 Isolierung von RNA

Die Isolierung erfolgte nach dem Protokoll von Stratagene mit dem „RNA Mikroprep-Kit“ (#400805).

Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte durch Messung der optischen Dichte mit einem NanDrop-Spektrometer (ND-1000) bei einer Wellenlänge von 260nm. Dafür wurden 2µl der in 30µl sterilem deionisierten Wasser (Braun) aufgenommenen RNA eingesetzt. Anhand der berechneten Konzentration konnte im Anschluss die entsprechende Menge an isolierter RNA für die reverse Transkription eingesetzt werden. Für die Umschreibung von mRNA in cDNA wurden pro Ansatz 1,5µg Total-RNA verwendet.

cDNA-Synthese durch reverse Transkriptase

Die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgte mit der reversen Transkriptase „SuperScript™ II“ und einem Poly(T)-Primer (CDS Primer) (5'-T(30)VN-3') [N = A,C,G oder T; V = A,G oder C]. Hierfür wurde ein Mastermix (Tab.10) und 1,5µg Total-RNA in 20µl sterilem deionisierten Wasser verwendet. Die reverse Transkription wurde für 90min bei 42°C im Eppendorf-Cycler ausgeführt. Im Anschluss erfolgte eine Fällung mit 4M LiCl und 96%igem Ethanol (EtOH) für 15min

(-70°C). Nach Zentrifugation (13.000rpm, 15min, 4°C) wurde das Pellet mit 500µl eiskaltem 70%igen EtOH gewaschen. Nach dem fast vollständigen Trocknen wurde das vorliegende Pellet in 50µl sterilem deionisierten Wasser für 10min bei RT unter leichtem Schütteln gelöst. Die Konzentration der erhaltenen cDNA wurde bestimmt. Die Lagerung der cDNA für die folgenden Real-Time-PCR-Experimente erfolgte bei -70°C.

Tab.10 Mastermix für die reverse Transkription

Reagenzien	Menge [µl]
RNA	20
Aqua dest.	7
5x First-Strand Puffer	10
0,1M DTT	5
dNTPs (10mM)	5
CDS Primer (50µM)	2
SuperScript™ II Reverse Transkriptase (200U/µl)	1
Gesamtvolumen	50

Die Tabelle enthält die Angaben für eine Probe (20µl RNA + 30µl Reagenzien-Mastermix = 50µl Gesamtvolumen)

Real-Time-PCR (RT-PCR)

Die Real-Time-PCR-Technologie erlaubt im Vergleich zur herkömmlichen PCR die Detektion des amplifizierten Produktes während des Reaktionsverlaufes. Dies geschieht bei der hier genutzten Methode über die Verwendung eines DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs (SYBR Green I), der mit der Menge an synthetisierter DNA korreliert. Nach Laserinduktion können die entsprechenden Fluoreszenzsignale gemessen werden.

Das Reaktionsvolumen pro Probe betrug 25µl, bestehend aus 15µl Mastermix (Tab.11) und 1µg cDNA in 10µl sterilem deionisierten Wasser. Für die Normalisierung des cDNA-Gehalts der untersuchten Proben wurden β-Aktin und Cyclophilin D verwendet (Tab.12). Die Messung erfolgte mit dem RT-PCR-Cycler BIO-RAD MyiQ. Bei jeder Messung wurden Negativ-Kontrollen ohne Einsatz von cDNA mitgeführt sowie im Anschluss eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um unspezifische Reaktionsprodukte wie z.B. Primerdimere auszuschließen.

Tab.11 Mastermixansätze für Real-Time-PCR.

	Real-Time-PCR [μ l]
Aqua dest.	6,875
10x PCR-Puffer	2,5
MgCl ₂ (25mM)	2
dNTPs (10mM)	0,5
10000x SYBR Green I	2,5
HotStarTaq DNA-Polymerase (5U/ μ l)	0,125
Primer-Mix	0,5
Gesamtvolumen	15

Die Tabelle enthält die Angaben für eine Probe.

Tab.12 Real-Time-PCR-Primer und amplifizierte PCR-Produkt-Größen.

Gen	„Forward Primer“	„Reverse Primer“	PCR-Produkt-(bp)
T-bet	5'-GTG TCT GGG AAG CTG AGA GTC -3'	5'-GGT GAA GGA CAG GAA TGG G -3'	104
Gata	5'-GCC TGC GGA CTC TAC CAT AA -3'	5'-CAT TAG CGT TCC TCC TCC AG -3'	145
RORγt	5'-GAC AGG GAG CCA AGT TCT CA -3'	5'-GCA GGA GTA GGC CAC ATT AC -3'	161
IL-17	5'-CTC CAG AAG GCC CTC AGA CTA C -3'	5'-GGC ACT GAG CTT CCC AGA T -3'	93
IL-21	5'-GAG CAT GCA GCT TTT GCC -3'	5'-GTT TCT TTC CTC CCC TCC TG -3'	108
IL-22	5'-GTG ACG ACC AGA ACA TCC AG -3'	5'-GCT TCT TCT CGC TCA GAC G -3'	146
IL-23 (p19)	5'-GCT TAA GGA TGC CCA GGT -3'	5'-ATG GTG TCC TTG CCC TTC -3'	136
IL-27 (p28)	5'-GTT GCT GCT ACC CTT GCT TC -3'	5'-TGG ACA TAG CCC TGA ACC TC -3'	144
IL-23R	5'-GGG TTG AGC CTG GTG AAA -3'	5'-CCA AAT CCG AGC TGT TGT TC -3'	161
IL-27R	5'-ATC CTG GAG GTG GAG GAA GT -3'	5'-AGA CTA GAA GGC CCA GCT CCT -3'	124

RANKL	5'-CGC AGA TTT GCA GGA CTC -3'	5'-CCC CAC AAT GTG TTG CAG -3'	115
MMP-2	5'-AGC GTG AAG TTT GGA AGC AT -3'	5'-CAC ATC CTT CAC CTG GTG TG -3'	105
MMP-3	5'-TGG AGA TGC TCA CTT TGA CG -3	5'-GCC TTG GCT GAG TGG TAG AG -3'	120
MMP-9	5'-CAT TCG CGT GGA TAA GGA GT -3'	5'-ATT TTG GAA ACT CAC ACG CC -3'	118
MMP-13	5'-AGT TGA CAG GCT CCG AGA AA -3'	5'-GGC ACT CCA CAT CTT GGT TT -3'	105
TIMP-1	5'-GGT GTT TCC CTG TTT ATC -3'	5'-TAG TTC TTT ATT TCA CCA TCT -3'	254
TIMP-2	5'-TTT CTT GAC ATC GAG GAC CC -3'	5'-TCC AGG AAG GGA TGT CAA AG -3'	108
TIMP-3	5'-TTG GGT ACC CTG GCT ATC AG -3'	5'-AGG TCT GGG TTC AGG GAT CT -3'	132
β-Aktin	5'-CCA CAG CTG AGA GGG AAA TC-3'	5'-TCT CCA GGG AGG AAG AGG AT-3'	108
Cyclo- philin D	5'-GCA AGG ATG GCA AGG ATT GA -3'	5'-AGC AAT TCT GCC TGG ATA GC -3'	150

Die Primer wurden von der Firma „metabion“ synthetisiert. Für die Real-Time-PCR wurden „Forward Primer“ und „Reverse Primer“ in einer Konzentration von 20µM eingesetzt.

3.2.13 Biochemische und immunbiochemische Protein-Nachweismethoden

Herstellung von Zelllysaten

Für die Analyse der Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren mittels Western Blot wurden Zellpellets ($2,5-3,5 \times 10^6$ Zellen) mit 250µl Lysispuffer (150mM NaCl; 20mM HEPES; pH7,5; 1% Triton X-100; 2,5mM MgCl₂) versetzt und 10-15min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine 20minütige Zentrifugation bei 13.000xg (4°C), um nicht-lysierte Zellbestandteile abzutrennen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford) wurden die Überstände bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese

Für die Protein-Auftrennung wurde die SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese in „Vertikal Elektrophorese Kammern“ der Firma Hoefer Pharmacia Biotech (San

Francisco, USA) genutzt. Dabei richtete sich die dafür notwendig Menge an Acrylamid/Bisacrylamidgemisches nach der Größe der aufzutrennenden Proteine. Aufgrund des relativ kleinen Molekulargewichtes der untersuchten Proteine (30-60kD) wurden 14%ige Gele verwendet. Für die elektrophoretische Trennung wurden Probe und Auftragspuffer im Verhältnis 2:1 gemischt und 5min bei 95°C inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer Stromstärke von konstant 22mA pro Gel und einer Spannung von maximal 150V unter Nutzung eines Elektrophoresepuffers mit SDS. Zur Molekulargewichtsbestimmung diente ein Gemisch Farbstoff-markierter Proteine der Firma Fermentas (Prestained Protein Ladder).

- *Trenngel*: 14% Acrylamid; 2M Tris-HCl; pH 8,8; 0,1% SDS
- *Sammelgel*: 4% Acrylamid; 0,5M Tris-HCl; pH 6,8; 0,1% SDS
- *Elektrophoresepuffer*: 25mM Tris; 200mM Glycin; 0,1% SDS
- *Probenpuffer*: 6% SDS; 4,32M β -Mercaptoethanol; 40% Glycerol; Bromphenolblau

Mittels eines „tank blotting“ Systems (Biorad) wurde das im SDS-Gel aufgetrennte Proteingemisch zur weiteren Analyse auf eine PVDF-Membran (Amersham Bioscience) übertragen. Vor dem Blotten wurden zwei Whatmann 3MM Filter, das Gel sowie die kurz in Methanol gelagerte Membran für 15min in Blot-Puffer inkubiert. Das „Blot-Sandwich“ setzte sich wie folgt zusammen: Kathode \Rightarrow Filter \Rightarrow Gel \Rightarrow Membran \Rightarrow Filter \Rightarrow Anode. Der Transfer erfolgte 90min bei einer Stromstärke von maximal 350mA und einer Spannung von 100V unter Kühlung.

- *Blot-Puffer*: 0,25M Tris/Base; 1,92M Glycin; 10% Methanol

Im Anschluss wurde die geblottete Membran mit TBS (Tris buffered saline: 10mM Tris; pH 7,5; 150mM NaCl) und 0,1% Tween20 gewaschen und mit 5% BSA/TBS/Tween20 für 1-2h bei RT geblockt, um die unspezifische Bindung sowie Hintergrundsignale so gering wie möglich zu halten. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (Tab.13) erfolgte ebenfalls in 5% BSA/TBS-Tween20 über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-Tween20 wurde die Membran für 1h bei RT mit dem entsprechenden Meerrettichperoxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (Tab.13) inkubiert. Zur Detektion wurde nach viermaligem Waschen mit TBS-Tween 20 das ECL-Plus Detektions-Kit der Firma GE Healthcare (Freiburg) verwendet. Durch die Reaktion der Peroxide entstand eine intensive Chemilumineszenz mit einem Emissionsmaximum bei 430nm. Diese wurde mit Hilfe des FluorChem FC2-

Gerätes nachgewiesen. Die Entwicklungszeit lag intensitätsabhängig zwischen 1 und 30min.

Tab.13 Antikörper für Western Blot

<i>Primärer Antikörper</i>	<i>Klon</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Firma</i>
mouse-anti-mouse FoxP3	eBio7979	0,5mg/ml (1:550)	eBioscience
rat-anti-mouse ROR γ	BD	0,5mg/ml (1:550)	eBioscience
mouse-anti-mouse T-bet	eBio4B10	0,5mg/ml (1:550)	eBioscience
mouse-anti-mouse Gata3	HG3-31	0,2mg/ml (1:550)	Santa Cruz
rat-anti-mouse GAPDH	14C10	1:1000	Cell Signaling
rabbit-anti-mouse β -Aktin		1:1000	Cell Signaling

<i>Sekundärer Antikörper</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Firma</i>
goat-anti-rabbit	1:5000	Santa Cruz
goat-anti-mouse	1:4000	Santa Cruz
goat-anti-rat	1:8000	eBioscience

3.2.14 FACS

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen aufgrund ihrer Expression von Oberflächenmolekülen und Transkriptionsfaktoren sowie der Produktion von Zytokinen unterschieden und charakterisiert werden. Für die Markierung der Zellen werden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet.

Für die Oberflächenfärbung wurden jeweils 4×10^6 Milzzellen arthritischer Tiere am Tag 1 verwendet. Die in FACS-Röhrchen überführten Zellen wurden zunächst mit PBA (PBS/BSA/Azid) gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem entsprechenden Volumen PBA resuspendiert. Die gesamte Färbung fand auf Eis bzw. im Kühlschrank und weitestgehend unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung statt. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen von Antikörpern an Fc γ II/III-Rezeptoren wurden die Zellen mit anti-CD16/CD32-AK (Klon 2.4G2) und normalem Ratten-IgG in PBA für 10min bei 7°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in PBA resuspendiert und unter Zugabe der entsprechenden Fluorochrom-markierten Antikörper (Tab.2) für weitere 30min bei 7°C inkubiert. Danach wurden die Zellen ein weiteres Mal gewaschen und mit 2% Paraformaldehyde (PFA) für 15min fixiert. Die fixierten Zellen wurden nach zweimaligem Waschen in PBA-Puffer aufgenommen und am Durchflusszytometer (Excalibur) analysiert. Isotypspezifische IgGs (Tab.2) bzw. wenn möglich Zellen vorhandener knock out-Tiere wurden verwendet, um die Spezifität der verwendeten AK zu überprüfen. Die Kontrollen wurden analog zu den Proben behandelt.

Für die intrazelluläre Färbung wurden die Milzzellen separat stimuliert. Hierfür wurden 4×10^6 Zellen pro Well einer anti-CD3/CD28 AK-beschichteten 12-Well-Platte eingesät. Die Stimulation erfolgte für 8h bei 37°C und 5% CO₂. Nach 2h wurde Monensin (Sigma, Endkonzentration im Well 1µM) zu den Zellen gegeben. Dies inhibiert die Zytokinfreisetzung aus dem Zytoplasma und führt zu deren Anreicherung in den Golgivesikeln. Nach der Stimulation wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt, mit PBA gewaschen und die Oberflächenfärbung wie zuvor beschrieben durchgeführt. Auch die folgende intrazelluläre Färbung wurde möglichst unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung auf Eis ausgeführt. Die Zellen wurden zunächst mit frisch angesetzter Fixierungs-/Permeabilisierungs-Lösung (eBioscience) für 45min bei 7°C inkubiert und im Anschluss mit Permeabilisierungs-Puffer (PP; eBioscience) gewaschen. Unspezifische Bindungen wurden mit normalem Ratten-IgG und anti-CD16/CD32 AK in PP für 10min blockiert. Nach wiederholtem Waschen erfolgte die Zugabe des Fluorochrom-markierten AK gegen FoxP3 sowie der AK gegen IL-17 bzw. IFN- γ (Tab.2). Nach 30minütiger Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PP gewaschen und dann für die Messung am Durchflusszytometer in PBA aufgenommen. Bestimmt wurde die Anzahl markierter T-Zellen.

3.2.15 Statistische Auswertung

Für die statistische Berechnung zur Prüfung der Gruppenunterschiede wurde mit dem nicht-parametrischen U-Test von Mann & Whitney mittels der Computersoftware SPSS 15.0 für Windows gearbeitet. Die errechneten p-Werte gaben an, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den zu untersuchenden Probengruppen vorlag. Dafür wurden die in Tab.14 dargestellten Einteilungen verwendet.

Tab.14 Signifikanzen

Signifikanz	p-Wert	Abbildung
nicht signifikant	$p > 0,1$	
eingeschränkt signifikant	$p \leq 0,1$	(*), (#)
signifikant	$p \leq 0,05$	*, #
stark signifikant	$p \leq 0,01$	**, ##
sehr stark signifikant	$p \leq 0,001$	***, ###

Die Ergebnisse in den Abbildungen dieser Arbeit stellen den arithmetischen Mittelwert der jeweiligen Gruppen mit dem Mittelwert des Standardfehlers (SEM) als Fehlerbalken dar.

4. Ergebnisse

Um die Bedeutung verschiedener Th-Zell-Subpopulationen und deren assoziierte Zytokine für die Induktion und Progression der AIA nachvollziehen und bewerten zu können, wurden im Wesentlichen zwei unterschiedliche experimentelle Strategien verfolgt. Zum einen kamen knock-out-Mäuse zum Einsatz, die entweder das pro-inflammatorische Zytokin IL-17 oder das als immunregulatorisch einzustufende Zytokin IFN- γ nicht exprimierten bzw. Tiere, die für beide Zytokine defizient waren. In einem weiteren Ansatz wurde der AIA-Verlauf nach Depletion bestimmter Th-Zellen (anti-CD25-AK-; anti-CD4-AK-Behandlung) oder nach Neutralisation des als Th1-Zytokin beschriebenen IFN- γ analysiert. Die Spezifität und biologische Wirkung der hierfür verwendeten AK wurde zuvor *in vitro* mit verschiedenen Methoden (WB, ELISA, FACS) getestet.

4.1 Untersuchung der AIA in IFN- γ -defizienten und anti-IFN- γ -AK-behandelten Mäusen

Die Charakterisierung der AIA in IFN- γ -defizienten bzw. in anti-IFN- γ -AK-behandelten Tieren erfolgte am Tag 3 nach Auslösen der Arthritis mittels Auswertung klinischer, histologischer und immunologischer Parameter. Für den angegebenen Zeitpunkt wurden jeweils zwei Studien durchgeführt.

4.1.1 Klinische Parameter der AIA

Die Messung der durch Antigenapplikation hervorgerufenen Kniegelenkschwellung erfolgte an den Tagen 1, 2 und 3 in der akuten Phase der Arthritis. Sowohl die IFN- γ ^{-/-} als auch die mit anti-IFN- γ -AK-behandelten Mäuse entwickelten gegenüber den Kontrolltieren (WT) eine signifikant erhöhte Kniegelenkschwellung im Krankheitsverlauf (Abb.10).

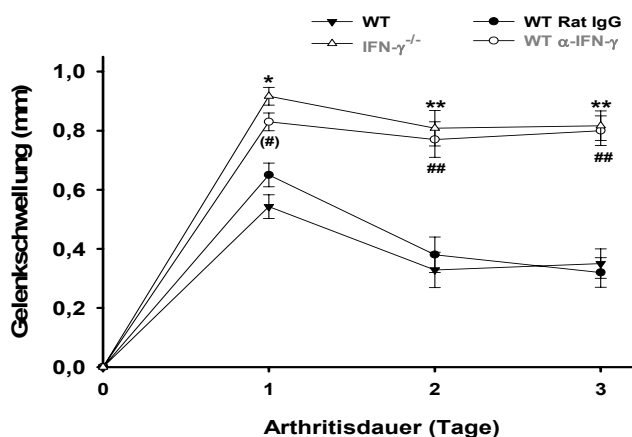


Abb.10 Verlauf der Kniegelenkschwellung.

Die Werte stellen die Differenz aus dem Gelenkdurchmesser zwischen Tag x und Tag 0 ($dx-d_0$) dar. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM einer repräsentativen Kurzzeitstudie mit IFN- γ ^{-/-} Mäusen: $n=10$; anti-IFN- γ -AK-behandelten Mäusen: $n=10$; WT bzw. Rat IgG-behandelten Mäusen: $n=10$ Tieren pro Gruppe mit (#) $p \leq 0,1$; * $p \leq 0,05$; **,## $p \leq 0,01$ im Vergleich zum entsprechenden WT.

4.1.2 Histologische Bewertung

Die Schwere der Arthritis wurde aus der histologischen Bewertung der Parameter der akuten und chronische Entzündung, der Knorpel- und Knochendestruktion sowie der sich daraus ergebenden Gesamtbeurteilung abgeleitet.

Die Histologien vom Tag 3 der AIA zeigten eine signifikant verstärkte akute Entzündung bei den IFN- $\gamma^{-/-}$ und anti-IFN- γ -behandelten Mäusen sowie eine signifikant erhöhte Knorpel- und Knochendestruktion (Destruktion) in den IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen. Der aus den Einzelbewertungen aufsummierte Gesamtarthritiscore war im Vergleich zu den Kontrolltieren bei den IFN- γ -defizienten Mäusen signifikant und bei den anti-IFN- γ -AK-behandelten Mäusen tendenziell höher (Abb.11).

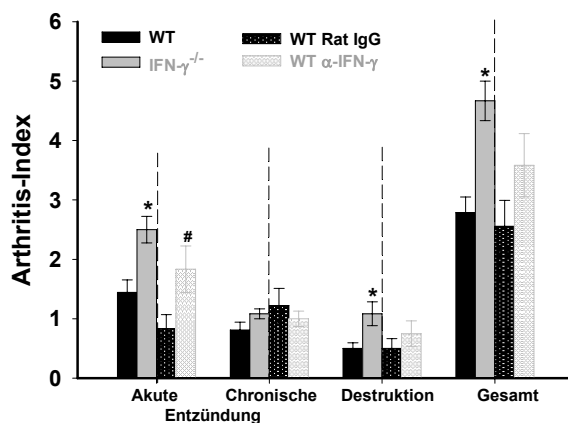


Abb.11 Histologien am Tag 3 der AIA. Die Bewertung erfolgte anhand des Arthritiscores (Tab.4). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM einer repräsentativen Kurzzeitstudie mit IFN- $\gamma^{-/-}$, WT bzw. anti-IFN- γ -AK- und Rat IgG-behandelten Mäusen aus n=10 Tieren pro Gruppe *,# $p \leq 0,05$ im Vergleich zur entsprechenden WT-Kontrolle.

4.1.3 Immunologische Parameter der AIA

Die untersuchten klinischen und histologischen Merkmale verdeutlichen den unterschiedlichen Verlauf der Arthritis bei den Kontrollen und den IFN- $\gamma^{-/-}$ bzw. anti-IFN- γ -behandelten Tieren. Um die dafür verantwortlichen zellulären Mechanismen zu erfassen, erfolgte die Bestimmung ausgewählter immunologischer Parameter unter Verwendung verschiedener molekularbiologischer Untersuchungsmethoden.

4.1.3.1 Zytokinbestimmung in Zellkulturüberständen

Durch Analyse der nach T-Zell-Rezeptor (TZR)-Stimulation sezernierten Zytokine können Rückschlüsse auf eine mögliche Verschiebung der Th-Zell-Balance gezogen werden.

Die Th2- und Th17-Zytokinproduktion der IFN- $\gamma^{-/-}$ Lymphknotenzellen (inguinal, popliteal, subaortal) war sowohl nach polyklonaler TZR-Stimulation mit anti-CD3-AK und CD28-Kostimulation als auch nach antigenspezifischer TZR-Aktivierung (mBSA) signifikant höher (mit Ausnahme von IL-21) als die vergleichbaren Wildtyp-Zellen (Abb.12A). Eine tendenziell höhere Zytokinsekretion durch die Th2- und Th17-

Subpopulationen war im Vergleich zu den Kontrollen auch bei stimulierten Milzzellen anti-IFN- γ -behandelter Mäuse messbar (Abb.12B). Sowohl die Defizienz von IFN- γ als auch die AK-vermittelte Neutralisation von IFN- γ führte stimuliunabhängig zur gesteigerten Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-17 in Milz- und Lymphknoten-Zellkulturen der entsprechenden Tiere und erwartungsgemäß zur fehlenden oder verringerten IFN- γ -Produktion (Abb.12).

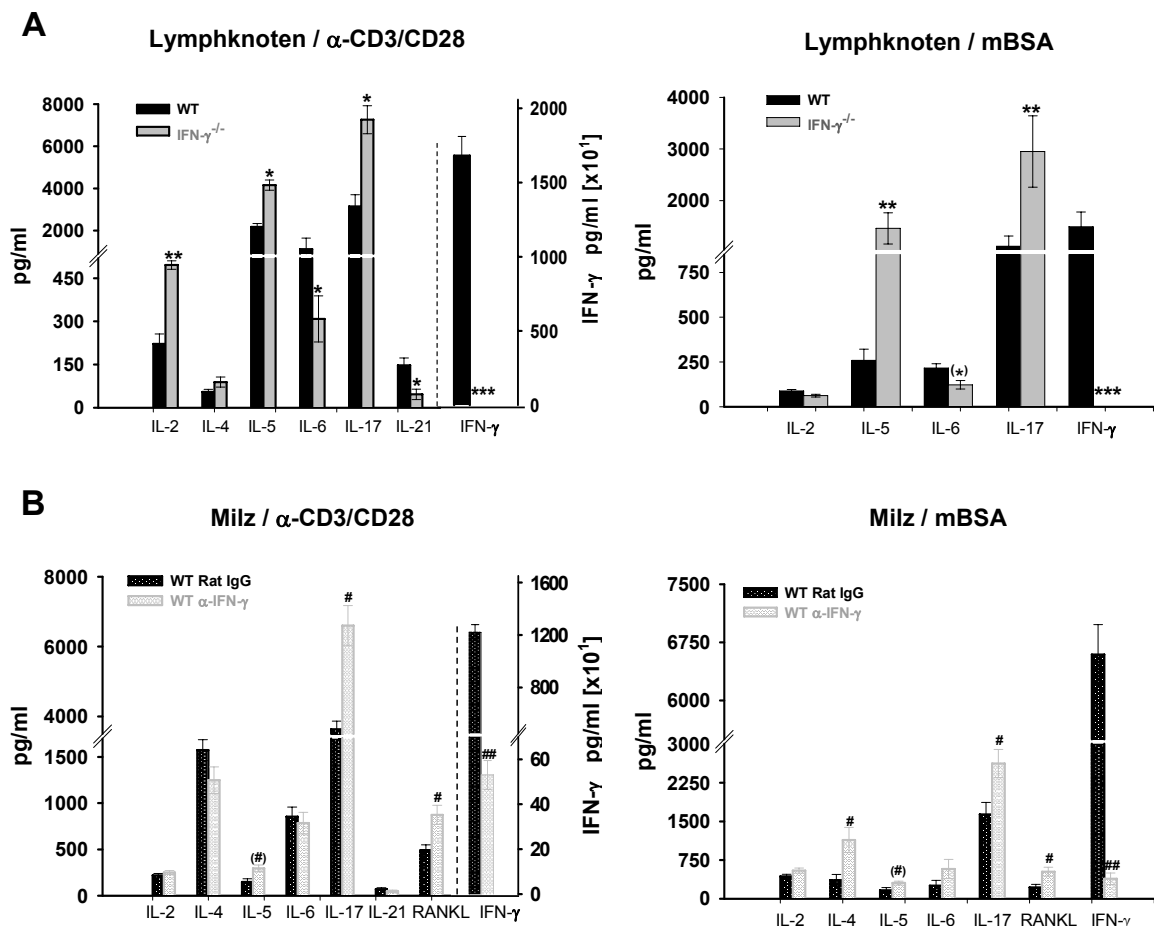


Abb.12 Zytokine in Kulturüberständen von Lymphknoten- und Milzzellen. Die Präparation der LK und Milzen erfolgte am Tag 3 nach AIA-Induktion. Der Zytokingehalt in den Überständen der Einzelsuspensionen wurde mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus n=10 Tiere pro Gruppe mit (*),(#) $p \leq 0,1$; *,# $p \leq 0,05$; **,## $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zu entsprechenden WT-Kontrollzellen.

4.1.3.2 Proliferationsassay

Um Erkenntnisse über das Expansionsverhalten von Th-Zellen in den verschiedenen Versuchsgruppen zu gewinnen, wurden Zellen aus den Milzen isoliert und der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin bei unterschiedlicher Stimulation des TZR gemessen. Die Milzzellen IFN- γ ^{-/-} und anti-IFN- γ -behandelter Mäuse zeigten unabhängig von der Stimulationsart eine signifikant höhere Thymidineinbaurrate. Dies weist auf eine deutlich gesteigerte Proliferation im Vergleich zu den Kontrolltieren hin (Abb.13).

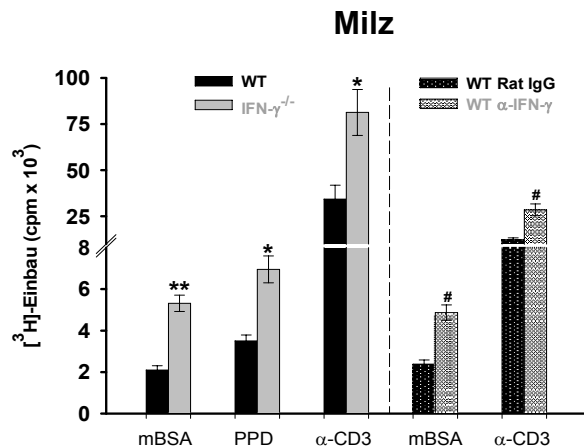


Abb.13 Proliferationsassay. Verwendet wurden Milz-Zellsuspensionen am Tag 3 nach AIA-Induktion, die für 42h mit mBSA, PPD oder anti-CD3 stimuliert wurden. Die Messung des [³H]-Thymidin-Einbaus erfolgte mittels Top-Counter. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus n=10 Tiere pro Gruppe mit *,# p≤0,05; ** p≤0,01 im Vergleich zur entsprechenden WT-Kontrolle.

4.1.3.3 mRNA-Expressionsanalysen von LK-Zellgemischen

Die Real-Time-PCR ermöglicht die Quantifizierung der Expression von Zytokinen, Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren bzw. deren Untereinheiten auf mRNA-Basis. Diese Methode bietet den Vorteil, dass Zellgemische auf ein breites Spektrum an Wachstums- und Differenzierungsmechanismen hin untersucht werden können, was letztendlich Schlussfolgerungen im Hinblick auf die Präsenz spezifischer Th-Zell-Subpopulationen in den peripheren Organen der verschiedenen Mausstämme zulässt.

Die LK von IFN-γ-defizienten Mäusen wiesen im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant höhere mRNA-Expression des gesamten Th17-Zytokinspektrum (IL-17; -21; -22) inklusive des Hauptregulators des Th17-Differenzierungsprogramms, dem Transkriptionsfaktor RORγt, auf (Abb.14). Die mRNA-Spiegel des für die Th1-Zellentwicklung notwendigen IL-27 mit seiner Rezeptoruntereinheit (IL-27R=WSX1) waren hier ebenfalls erhöht. Im Gegensatz zum Th2-spezifischen Transkriptionsfaktor GATA3 ist der IFN-γ-abhängige Transkriptionsfaktor T-bet (typisch für Th1-Zellen) und das Zytokin IL-10 in IFN-γ-defizienten Mäusen gegenüber dem WT signifikant herunterreguliert (Abb.14).

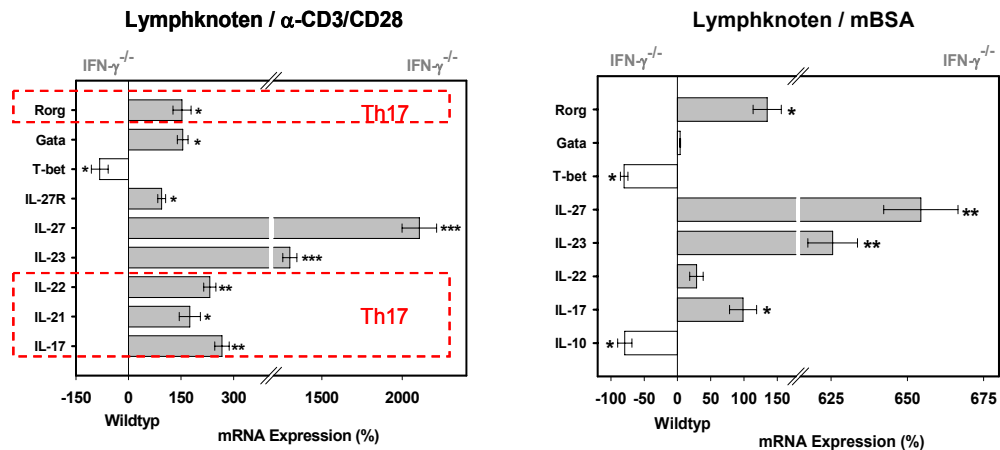


Abb.14 mRNA-Expression in LK von IFN-γ^{-/-} und WT-Mäusen: Am Tag 3 nach AIA-Induktion erfolgte die Isolierung der Zellen aus den LK mit nachfolgender Stimulation (mBSA bzw. anti-CD3/CD28-AK) in 12-Well-Platten für 48h. Nach RNA-Isolierung sowie Umschreibung der mRNA in cDNA unter Verwendung eines Poly(T)-Primers wurde die semiquantitative Bestimmung der mRNA-Expression von Transkriptionsfaktoren (Rorγ, Gata, T-bet) und Zytokinen mittels Real-Time-PCR durchgeführt. * p≤0,05; ** p≤0,01; *** p≤0,001 im Vergleich zu WT-Zellen.

4.1.3.4 mRNA-Expressionsanalysen im Augenblut

Die Lymphozytenisolierung aus Augenblut eröffnet die Möglichkeit, schon während der Immunisierungsphase und der AIA-Induktion die Th-Differenzierung bzw. eine auftretende Verschiebung der Th-Zellbalance in einem Tier zu analysieren und mit der *in vitro*-Situation nach Stimulation entsprechend isolierter Milz- und LK-Zellen am Ende eines Experiments zu vergleichen.

Die Mäuse, die mit anti-IFN-γ behandelt wurden, zeigten in zwei repräsentativen Studien im Vergleich zu den Kontrolltieren zum Zeitpunkt der 1. Immunisierung eine signifikant höhere Expression typischer Th17-Zytokine im Blut, die im Verlauf der Immunisierungsphase (Tag -8) sowie am Tag 1 nach Arthritisinduktion deutlich abnahm (Abb.15). Eine ähnliche Expressionskinetik konnte für FoxP3, dem Transkriptionsfaktor für regulatorische T-Zellen, beobachtet werden. Hingegen erhöhte sich während der Arthritisinduktion der mRNA-Spiegel des für die Th1-Population wichtigen Zytokins IL-27 nach IFN-γ-Neutralisation signifikant (Abb.15).

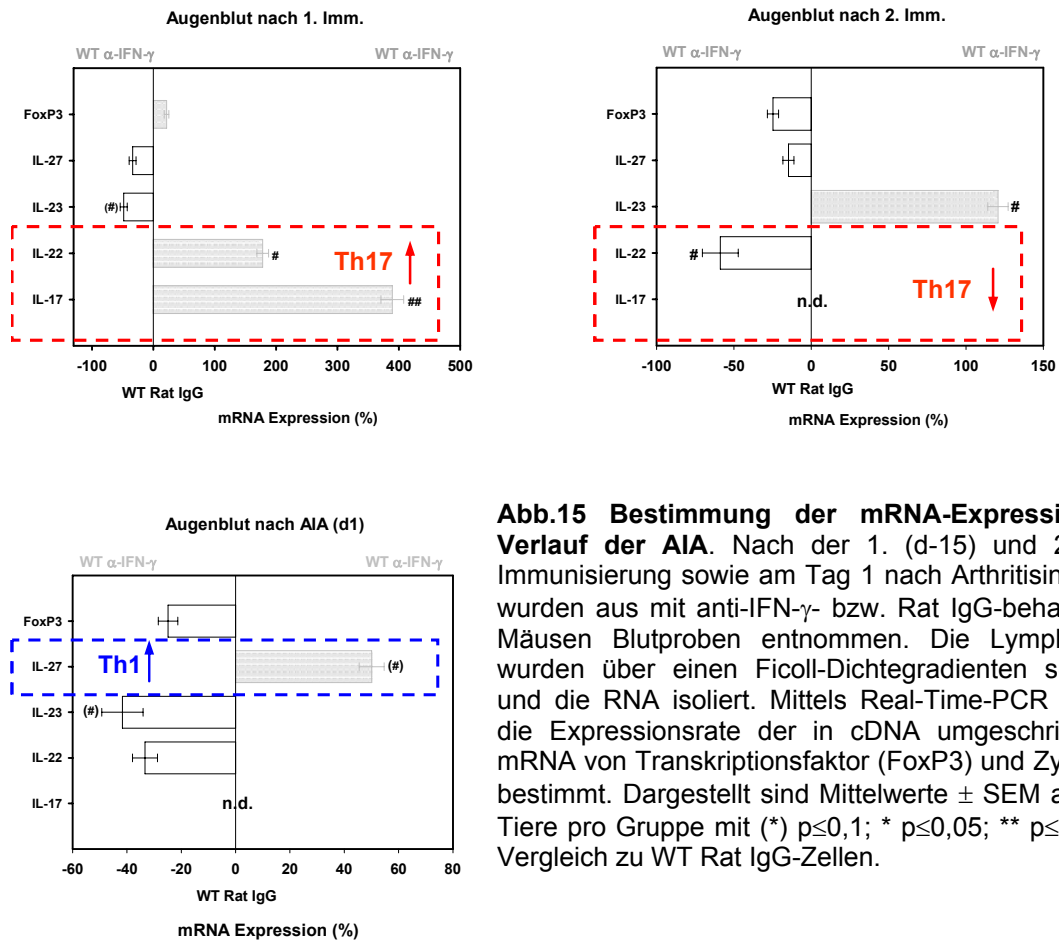


Abb.15 Bestimmung der mRNA-Expression im Verlauf der AIA. Nach der 1. (d-15) und 2. (d-8) Immunisierung sowie am Tag 1 nach Arthritisinduktion wurden aus mit anti-IFN- γ - bzw. Rat IgG-behandelten Mäusen Blutproben entnommen. Die Lymphozyten wurden über einen Ficoll-Dichtegradienten separiert und die RNA isoliert. Mittels Real-Time-PCR wurden die Expressionsrate der in cDNA umgeschriebenen mRNA von Transkriptionsfaktor (FoxP3) und Zytokinen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus n=6 Tiere pro Gruppe mit (*) $p \leq 0,1$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ im Vergleich zu WT Rat IgG-Zellen.

4.1.3.5 Charakterisierung von Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie

Zur weiteren Aufklärung funktioneller Veränderungen in der IFN- $\gamma^{-/-}$ Maus im AIA-Modell wurde die zelluläre Zusammensetzung von Milzen am Tag 1 nach Arthritisinduktion mit entsprechenden Wildtyp-Kontrollen hinsichtlich der Zahl CD4⁺ und CD8⁺ Zellen sowie CD4⁺FoxP3⁺ und CD4⁺IL-17⁺ Zellen verglichen. Die intrazelluläre Färbung von FoxP3 erfolgte dabei einmal direkt nach Präparation der Milzzellen bzw. nach achtstündiger Restimulation mit anti-CD3/CD28-AK.

Die FACS-Analysen der Zelloberflächenmoleküle zeigten eine tendenzielle Erhöhung der Zahl CD4⁺ Zellen sowie eine signifikant vergrößerte Population CD8⁺ Zellen in IFN- γ -defizienten Mäusen (Abb.16). Trotz der gesteigerten Menge CD4⁺ Zellen bei IFN- γ -Defizienz fällt die Zahl der FoxP3-exprimierenden und damit die Anzahl CD4⁺ FoxP3⁺ Zellen, die direkt nach der Zellisolation gemessen wurde, im Vergleich zum WT deutlich schwächer aus (Abb.16). Wurden die Milzzellen hingegen *ex vivo* mit anti-CD3/CD28-AK stimuliert, konnte der Wegfall von IFN- γ kompensiert werden und die FoxP3-Expression war mit der des Wildtyps identisch. Die Detektion einer erhöhten Zahl CD4⁺IL-17-Produzenten in den Milzen IFN- γ -defizienter Mäuse

bestätigte die erhöhte IL-17-Konzentration, welche in den Kulturüberständen von IFN- γ ^{-/-} Zellen gemessen wurde (Abb.16).

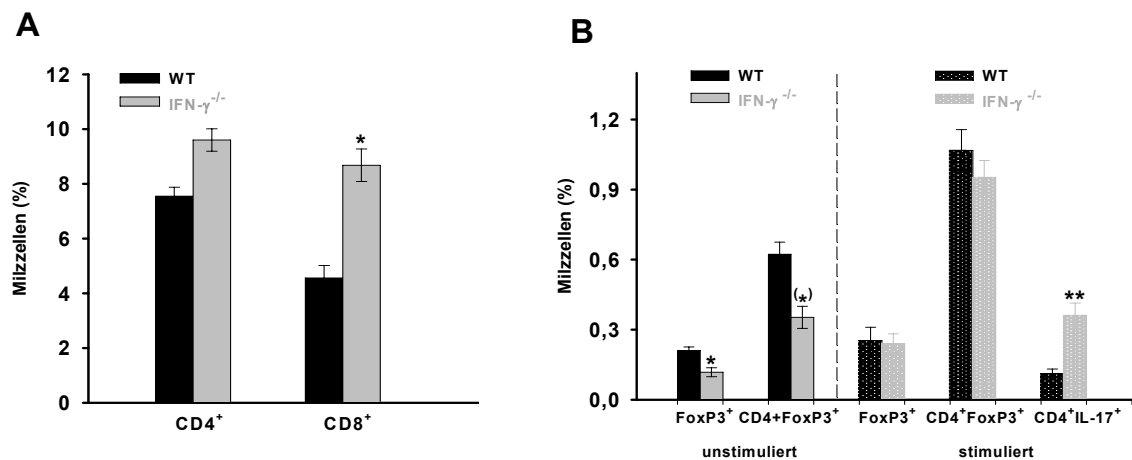


Abb.16 Durchflusszytometrischer Nachweis CD4⁺ und CD8⁺ Milzzellen sowie von FoxP3 und IL-17. Die Milzzellen wurden am Tag 1 nach Arthritisinduktion aus IFN- γ ^{-/-} bzw. Wildtyp-Mäusen isoliert und A.) im unstimulierten Zustand mit Fluorochrom-gekoppeltem AK gegen die Zelloberflächenmoleküle CD4 und CD8 markiert bzw. erfolgte B.) die intrazelluläre Färbung von FoxP3 im unstimulierten sowie die Färbung von FoxP3, IL-17 und CD4 im anti-CD3/CD28-stimulierten Zustand. Die Messungen wurden jeweils mit n=6 Tiere pro Gruppe durchgeführt. (*) $\leq 0,1$; * $p \leq 0,05$ im ** $p \leq 0,01$ im Vergleich zu WT-Zellen

Zusammenfassung

Sowohl der genetische Knock-out von IFN- γ als auch die Antikörper-vermittelte Neutralisation des Zytokins führten zu einem klinisch und histologisch schwereren Verlauf der AIA (Abb.10, 11). Ursache hierfür war die Veränderung der zellulären Immunantwort durch Manipulation der IFN- γ -Verfügbarkeit. Neben einer deutlich stärkeren Milzzell-Proliferationsrate ließ sich in den Überständen von Lymphknoten- und Milz-Zellsuspensionen eine signifikant erhöhte Sekretion der Mehrzahl der getesteten Zytokine (IL-2, IL-4, IL-5, IL-17, RANKL) nachweisen und dies unabhängig von der Art der Herbeiführung des IFN- γ -Mangels (Abb.12). Besonders auffällig war die starke Expression Th17-Zell-spezifischer Zytokine sowie des Transkriptionsfaktors ROR γ t auf mRNA- bzw. Proteinebene. Hingegen wirkte sich der Mangel an IFN- γ negativ auf die Expression des für die Th1-Differenzierung notwendigen Transkriptionsfaktors T-bet aus (Abb.14). Die Behandlung mit anti-IFN- γ -AK führte zur Erhöhung der Th17-Antwort am Anfang der Immunisierungsphase, gefolgt von einer vermehrten Produktion des für die Th1-Entwicklung essentiell wichtigen Zytokins IL-27 während der Arthritisinduktion (Abb.15). Zudem exprimierten am Beginn der AIA weniger IFN- γ ^{-/-} Milzzellen den Treg-spezifischen Transkriptionsfaktor FoxP3 als vergleichbare WT-Kontrollen (Abb.16).

4.2 Der Einfluss der Depletion $CD4^+$ Zellen auf die AIA in $IFN-\gamma^{-/-}$ Mäusen

4.2.1 Klinische und histologische Parameter

Der Verlauf der Kniegelenkschwellung wurde an den Tagen 1, 2 und 3 nach Arthritis-Induktion erfasst. Die zweimalige Injektion von $IFN-\gamma^{-/-}$ Mäusen mit anti-CD4-AK kurz vor dem Auslösen der AIA (siehe Zeitschema Abb.7) führte im Vergleich zur Rat IgG-Kontrollbehandlung zu einem signifikant milderen Verlauf der akuten Phase (Abb.17A). Der klinische Effekt der CD4-Depletion spiegelte sich auch in der histopathologischen Bewertung wider. Die zelluläre Infiltration der Synovialmembran sowie die Destruktion von Knorpel und Knochen fielen in den mit anti-CD4-AK-behandelten Tieren deutlich schwächer aus (Abb.17B).

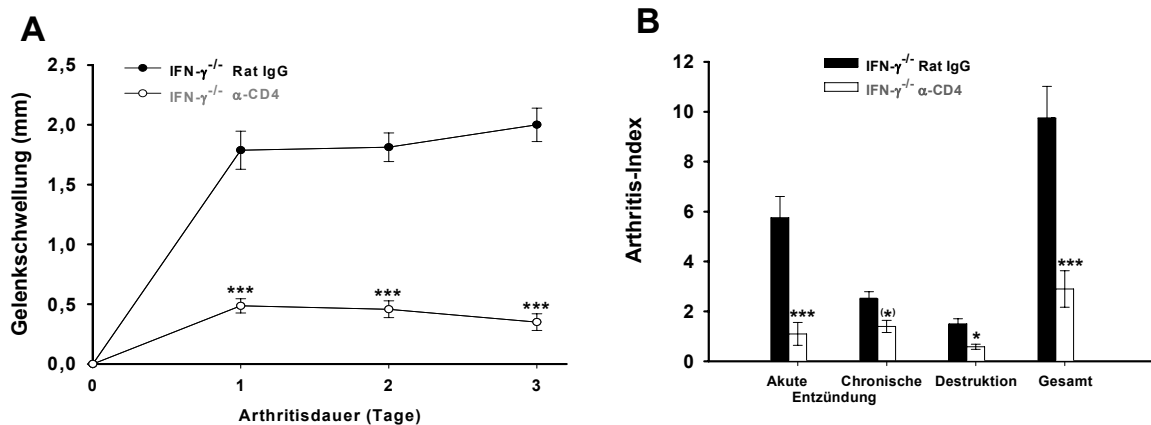


Abb.17 Verlauf der Kniegelenkschwellung und histologische Bewertung der AIA nach anti-CD4-AK-Applikation. Die Immunisierung und Arthritisinduktion erfolgte nach dem Schema in Abb.6. Vor Induktion der AIA (d-7; d-3) wurde eine Gruppe $IFN-\gamma^{-/-}$ Mäuse mit anti-CD4-AK (jeweils 250 μ g zu beiden Zeitpunkten) bzw. eine Kontrollgruppe mit normalem Ratten IgG behandelt. A) Die Werte stellen die Differenz aus dem Gelenkdurchmesser zwischen Tag x und Tag 0 ($dx-d_0$) dar. B) Die Bewertung der Histologien erfolgte anhand des Arthritiscores (Tab.4). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM einer repräsentativen Kurzzeitstudie mit $n=8$ Tiere pro Gruppe. (*) $p \leq 0,1$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zur $IFN-\gamma^{-/-}$ Rat IgG-Kontrolle.

4.2.2 Immunologische Parameter der AIA

4.2.2.1 Durchflusszytometrische Beurteilung der CD4-Depletion

Zum Nachweis einer effektiven CD4-Depletion wurden am Tag 1 nach Arthritis-induktion die Membranproteine CD4, CD8 und CD3 von Milzzellen anti-CD4-AK- bzw. Ratten IgG-behandelter $IFN-\gamma^{-/-}$ Tiere mit spezifischen fluorchrom-gekoppelten Antikörpern markiert.

Mit der intraperitonealen Applikation des anti-CD4-AK an den Tagen -7 und -3 vor Induktion der AIA konnte eine bis zu 80%ige Reduzierung der $CD4^+$ Zellen in den entsprechenden Mäusen erreicht werden. Die Zahl der $CD8^+$ Zellen blieb infolge der

CD4-Depletion unbeeinflusst, während sich die Gesamtzahl der T-Zellen ($CD3^+$) durch die Depletion verringerte (Abb.18).

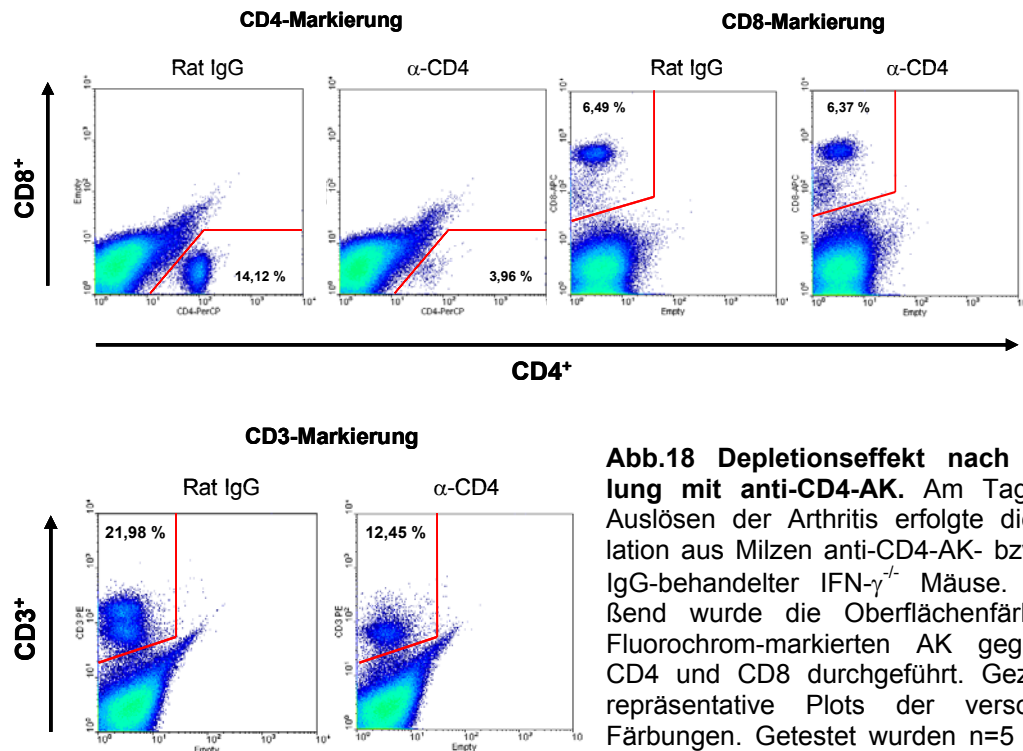


Abb.18 Depletionseffekt nach Behandlung mit anti-CD4-AK. Am Tag 1 nach Auslösen der Arthritis erfolgte die Zellisolation aus Milzen anti-CD4-AK- bzw. Ratten IgG-behandelter $IFN-\gamma^{-/-}$ Mäuse. Anschließend wurde die Oberflächenfärbung mit Fluorochrom-markierten AK gegen CD3, CD4 und CD8 durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative Plots der verschiedenen Färbungen. Getestet wurden n=5 Tiere pro Gruppe.

4.2.2.2 Zytokinbestimmung in Zellkulturüberständen

Unabhängig von der Art der TZR-Stimulation war die Konzentration der Zytokine, die in den Milzzellüberständen anti-CD4-AK-behandelter Tiere bestimmt wurde, tendenziell bis signifikant niedriger als die der jeweiligen Kontrollen (Abb.19).

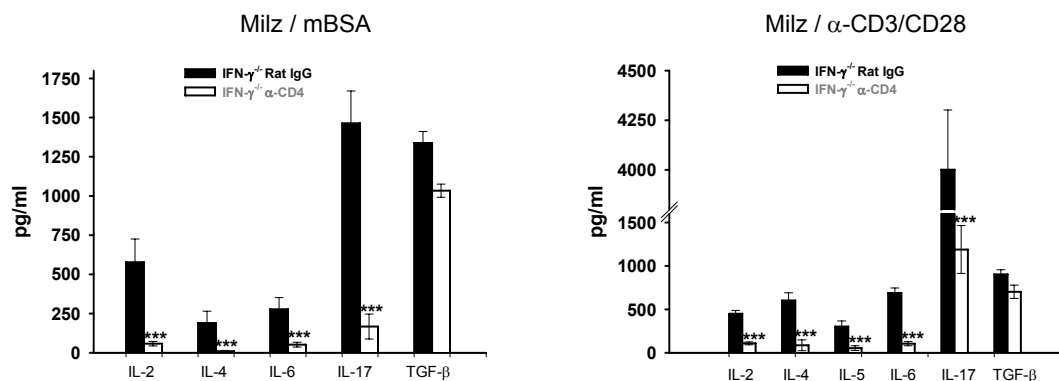


Abb.19 Zytokinmessung in Milzzellüberständen. Die Milzen wurden am Tag 3 nach AIA-Induktion präpariert. Die Bestimmung des Zytokingehaltes in den Überständen der wie angegeben stimulierten Einzelzellsuspensionen erfolgte mittels ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus n=10 Tiere pro Gruppe mit *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zur IFN- $\gamma^{-/-}$ Rat IgG-Kontrolle.

4.2.2.3 Proliferationsassay

In Bestätigung der bisherigen Ergebnisse bedingte die CD4-Depletion sowohl nach mBSA- als auch nach anti-CD3/CD28-Stimulation eine signifikant niedrigere Proliferationsrate der Milzzellen von IFN- γ ^{-/-} Mäusen (Abb.20).

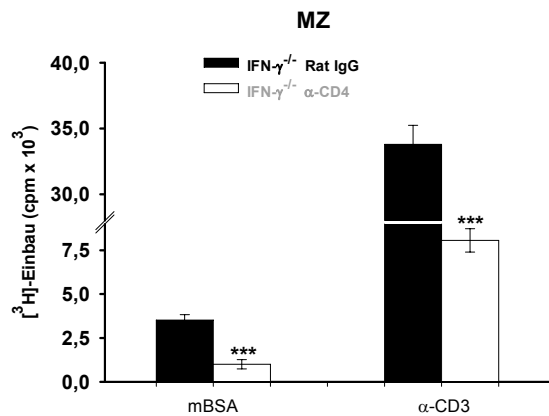


Abb.20 Proliferationsassay. Verwendet wurden Zellsuspensionen von Milzen, die am Tag 3 nach AIA-Induktion präpariert und wie angegeben stimuliert wurden. Der [³H]-Thymidin-Einbau wurde mittels Top-Counter gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von n=10 Tiere pro Gruppe mit *** p \leq 0,001 im Vergleich zur IFN- γ ^{-/-} Rat IgG-Kontrolle.

Zusammenfassung

Die Behandlung von IFN- γ -defizienten Mäusen mit anti-CD4-AK führte zu einem stark verringerten, klinisch kaum messbaren AIA-Verlauf (Abb.17). Grund hierfür war die Abnahme der Immunantwort als Folge der verminderten Zahl CD4⁺ Zellen (Abb.18), was letztendlich die Vermittlung von Entzündungs -und Destruktionsprozessen stark einschränkte.

4.3 Die AIA bei Defizienz des proinflammatorischen Zytokins IL-17

4.3.1 Klinischer Verlauf und histologische Bewertung der AIA bei IL-17-defizienten Tieren

Die Veränderung des Kniegelenkdurchmessers wurde bei den IL-17-defizienten Mäusen und dem Wildtyp an den ersten drei Tagen der akuten Phase der Arthritis erfasst.

Das Fehlen des proinflammatorischen Zytokins IL-17 in C57Bl/6-Mäusen führte zu einem deutlich milderen klinischen Verlauf der AIA. Ebenfalls reduziert war die Menge typischer Entzündungszellen wie Granulozyten und Makrophagen im Kniegelenkspalt IL-17-defizienter Tiere (Abb.21).

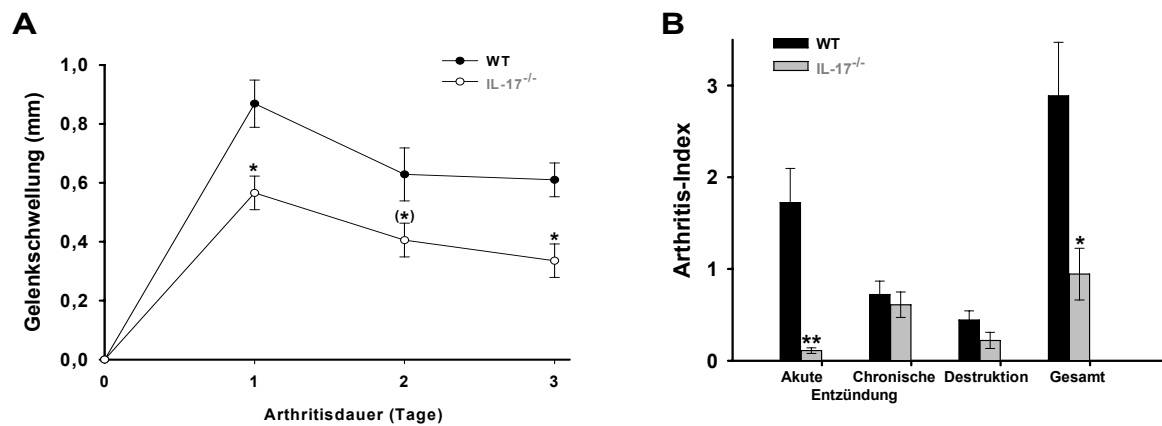


Abb.21 Verlauf der Kniegelenkschwellung und histologische Beurteilung der AIA IL-17-defizienter Mäuse. A) Die Gelenkschwellung von WT und IL-17^{-/-} Mäusen wurde an den Tagen 1, 2 und 3 nach Arthritisinduktion gemessen. B) Die Bewertung der histologischen Präparate wurde anhand des Arthritiscores (Tab.4) durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM einer repräsentativen Kurzzeitstudie mit n=10 Tiere pro Gruppe mit (*) $p \leq 0,1$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ im Vergleich zum WT.

4.3.2 Immunologische Parameter der AIA

4.3.2.1 Proliferationsassay

Die am Tag 3 der AIA isolierten LK- und Milz-Zellen IL-17-defizienter Tiere zeigten nach Antigen-spezifischer Stimulation (mBSA, PPD) deutlich niedrigere Wachstumsraten als die vergleichbaren WT-Kontrollen (Abb.22). Die polyklonale TZR-Stimulation mit anti-CD3/CD28 brachte keine messbaren Proliferationsunterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Unabhängig von der IL-17-Defizienz reagierten die LK-Zellen stärker auf die Proliferationsstimuli als Milz-Zellen (Abb.22).

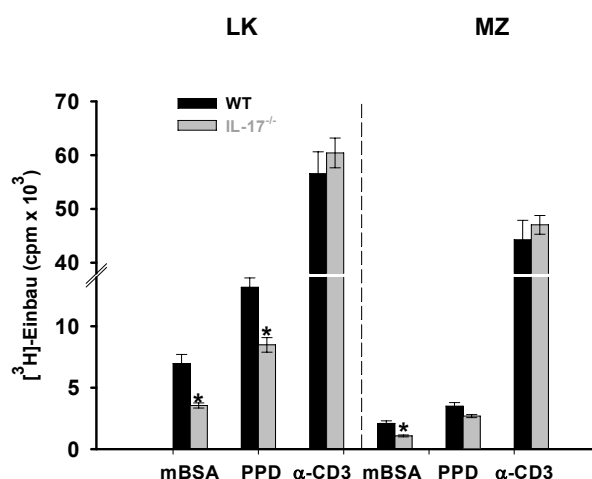


Abb.22 Proliferationsassay. Verwendet wurden Lymphknoten- und Milzzellsuspensionen am Tag 3 nach AIA-Induktion, die aus WT und IL-17^{-/-} Mäusen mit mBSA, PPD und anti-CD3/CD28-AK für 42h stimuliert und für weitere 18h mit [³H]-Thymidin inkubiert wurden. Die Messung der [³H]-Thymidin-Einbaurate erfolgte mittels Top-Counter. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus n=10 Tiere pro Gruppe mit * $p \leq 0,05$ im Vergleich zum WT.

4.3.2.2 mRNA-Expressionsanalysen und Zytokinbestimmung von LK-Zellen

Die Zytokinsekretion von IL-17^{-/-} Lymphozyten, die am Tag 3 der AIA isoliert wurden, war sowohl nach polyklonaler als auch nach Antigen-spezifischer TZR-Stimulation zum Teil signifikant niedriger als die vergleichbarer WT-Zellen (Abb.23A). Eine Ausnahme bildete das als Bestandteil der Th2-Antwort anzusehende IL-5, welches stimulationsunabhängig verstärkt von Lymphozyten IL-17-defizienter Tiere sezerniert wurde (Abb.23A).

Die Ergebnisse der mRNA-Expressionanalyse TZR-stimulierter Lymphozyten bestätigten das in den Kulturüberständen gemessene Zytokinprofil. Das Expressionsniveau der unterschiedlichen Th-Zell-typischen Zytokine und Transkriptionsfaktoren lag vor allem nach Antigen-spezifischer Stimulation von IL-17^{-/-} Lymphknotenzellen unter dem vergleichbarer WT-Zellen (Abb.23B). Eine Ausnahme bildete der für regulatorische T-Zellen essentielle Transkriptionsfaktor FoxP3. Unabhängig vom jeweiligen Stimulus waren in IL-17^{-/-} Lymphozyten höhere FoxP3 mRNA-Spiegel als in WT-Zellen detektierbar (Abb.23B). Auffällig war ebenfalls die Hochregulation der mRNA-Expression der Th1- bzw. Th17-Differenzierungszytokine IL-27 bzw. IL-23 in den mit anti-CD3/28-stimulierten LK-Zellkulturen IL-17-defizienter Tiere (Abb.23B).

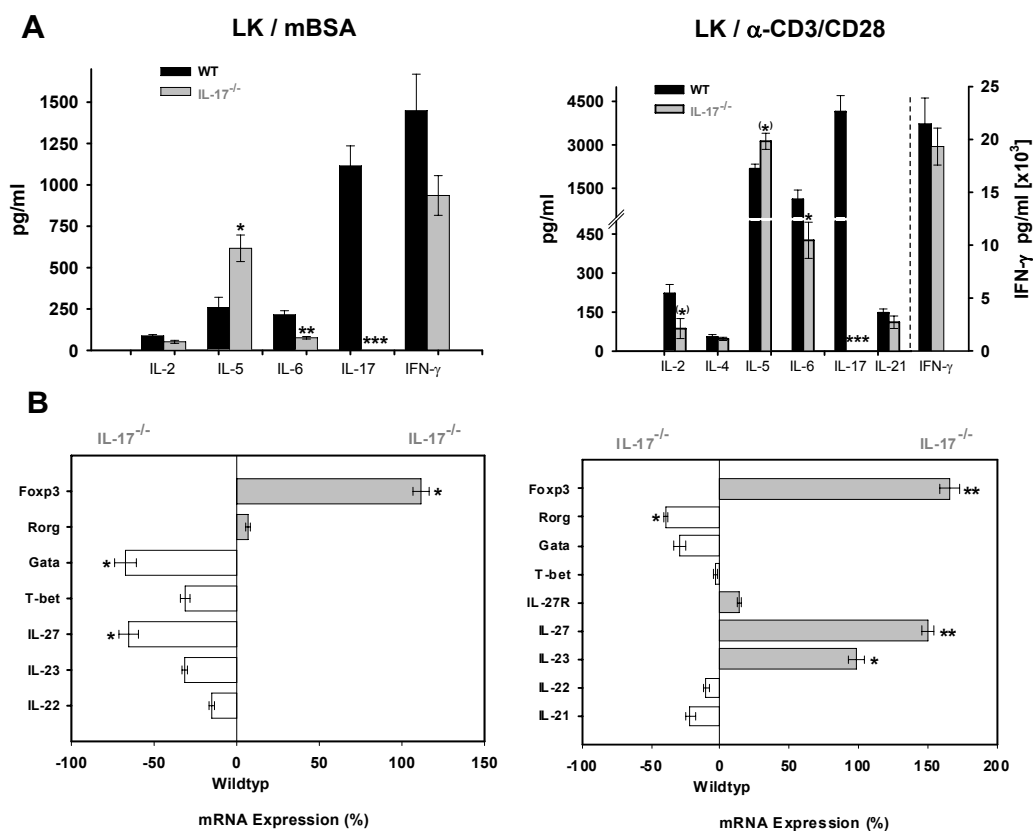


Abb.23 Zytokinsekretion und mRNA-Expression. Die Präparation der LK der jeweiligen Versuchstiere erfolgte am Tag 3 nach AIA-Induktion. Aus den Überständen der mit mBSA- bzw. anti-CD3/CD28-stimulierten Einzelzellsuspensionen wurde A) mittels ELISA der Zytokingehalt bestimmt bzw. B) aus den Zellpellets die RNA isoliert, die mRNA unter Verwendung eines Poly(T)-Primers in cDNA umgeschrieben und diese mittels Real-Time-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus n=10 Tiere pro Gruppe mit (*) $p \leq 0,1$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zum WT.

4.3.2.3 Charakterisierung von Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie

Die bisher bestimmten immunologischen Parameter könnten auf eine abnehmende Zahl $CD4^+$ Zytokinproduzenten als Folge des IL-17-Mangels hindeuten. Überraschenderweise wurde aber in den Milzen IL-17-defizienter Tiere im Vergleich zum WT während der akuten Phase der AIA sogar eine leicht erhöhte Zahl $CD4^+$ Zellen nachgewiesen (Abb.24A). Keine Unterschiede zeigten sich dagegen bei der Zahl $CD8^+$ Zellen sowie bei der Zahl $FoxP3^+$ und $CD4^+FoxP3^+$ Zellen (Abb.24A,B). In Bestätigung der geringeren Konzentration an $IFN-\gamma$ in IL-17^{-/-} Zellkulturüberständen wurden auch nach intrazellulärer Färbung bei IL-17-defizienten Zellen weniger $IFN-\gamma$ -Produzenten detektiert (Abb.24B).

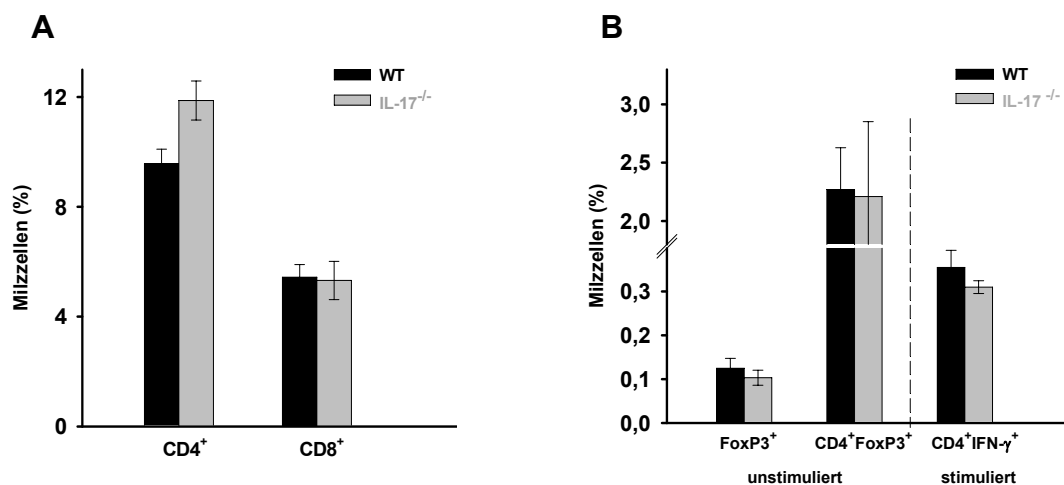


Abb.24 Durchflusszytometrischer Nachweis $CD4^+$ und $CD8^+$ Milzzellen sowie von FoxP3 und $IFN-\gamma$. Die Milzzellen wurden am Tag 1 nach Arthritisinduktion aus IL-17^{-/-} bzw. Wildtyp-Mäusen isoliert und A.) im unstimulierten Zustand mit Fluorochrom-gekoppeltem AK gegen die Zelloberflächenmoleküle CD4 und CD8 markiert bzw. erfolgte B.) die intrazelluläre Färbung von FoxP3 im unstimulierten sowie die Färbung von CD4 und $IFN-\gamma$ im anti-CD3/CD28-stimulierten Zustand. Die Messungen wurden jeweils mit n=6 Tiere pro Gruppe durchgeführt.

4.3.2.4 Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 bei IL-17-Defizienz

Während bei den IL-17^{-/-} Mäusen eine deutlich stärkere mRNA-Expression von FoxP3 in LK-Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb.23), zeigten die Milzen IL-17-defizienter und WT-Tiere am Tag 1 nach AIA-Induktion hinsichtlich der Zahl $FoxP3^+$ Zellen keine Unterschiede (Abb.24).

Die Mengen an FoxP3, die am Tag 1 der akuten Phase mittels Western Blot (WB) in Lysaten $CD4^+$ IL-17^{-/-} und WT-Milzzellen nachgewiesen wurden, unterschieden sich ebenfalls nur unwesentlich (Abb.25.).

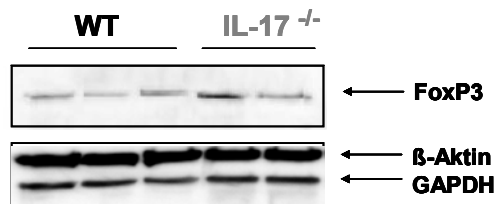


Abb.25 FoxP3-Nachweis in Milzzellen. CD4⁺ Milzzellen wurden am Tag 1 nach AIA-Induktion aus WT- und IL-17^{-/-} Mäusen isoliert, im unstimulierten Zustand lysiert und die Lysate anschließend im WB mit anti-FoxP3-AK analysiert. Als Ladekontrollen dienten β-Aktin und GAPDH.

Zusammenfassung

Im Modell der AIA hatte das Fehlen des proinflammatorischen Zytokins IL-17 einen milderen Krankheitsverlauf sowie deutlich weniger ausgeprägte Entzündungs- und Destruktionsmerkmale im arthritischen Kniegelenk zur Folge (Abb.21). Erwartungsgemäß wurde in Übereinstimmung mit den klinischen und histologischen Befunden eine abgeschwächte Immunantwort, gekennzeichnet durch eine verminderte LK- und Milz-Zellexpansion (Abb.22) sowie eine verringerte Zytokinproduktion (Abb.23), bei IL-17-Mangel nachgewiesen. Interessanterweise war die Zahl CD4⁺ Zellen in IL-17^{-/-} Tieren nach Arthritisinduktion im Vergleich zum WT leicht erhöht (Abb.24). Hingegen konnten bei der Menge CD8⁺ und FoxP3⁺ Zellen in den Milzen keine Unterschiede zum WT festgestellt werden (Abb.24). Im Vergleich zur nahezu konstant bleibenden FoxP3-Menge in IL-17^{-/-} und WT-Milzzellen, die nach Arthritisinduktion im WB detektiert wurde (Abb.25), zeigten TZR-stimulierte IL-17-defiziente LK-Zellen erhöhte FoxP3 mRNA-Spiegel (Abb.23).

4.4 Vergleich der AIA in IL-17-defizienten und Wildtyp-Tieren nach Depletion regulatorischer T-Zellen

Wie bereits in unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde (Frey et al., 2004), führt die Depletion regulatorischer T-Zellen (Treg) zu einer Exazerbation der AIA. Um die Effekte der Treg-Depletion auf die AIA möglichst vergleichbar zu gestalten sowie der ständig fortschreitenden Entwicklung bzgl. Th-Zell-Differenzierung und -Interaktion Rechnung zu tragen, wurden IL-17^{-/-} und WT-Mäuse nach dem gleichen Zeitschema mit identischen Dosen anti-CD25-AK behandelt (Abb.7). Die Nutzung eines AK, der gegen die durch Treg-Zellen konstitutiv exprimierte α-Kette des IL-2-Rezeptors gerichtet ist, stellt bislang die gebräuchlichste Methode zur Charakterisierung dieser Zellpopulation im Tiermodell dar. Die Bestimmung des klinischen Verlaufes der Arthritis nach Treg-Depletion in den verschiedenen Mausstämmen erfolgte durch tägliche Messung der Kniegelenkschwellung während der akuten Phase der Erkrankung.

4.4.1 Depletion CD25⁺ Zellen in WT-Tieren

4.4.1.1 Klinische und histologische Parameter

Die mit anti-CD25-behandelten Tiere zeigten, verglichen mit den Ratten IgG-behandelten Kontrollen, zu allen Messzeitpunkten während der akuten Phase der Arthritis eine signifikant stärkere Kniegelenkschwellung (Abb.26A). In Übereinstimmung mit den klinischen Daten wurde in den Histologien CD25-depletierter Tiere ein signifikant stärkerer Grad an Entzündung und Destruktion festgestellt (Abb.26B).

Die Effektivität der Treg-Depletion in den entsprechend behandelten Tieren wurde während der Immunisierung (Tag -6) sowie nach Arthritisinduktion (Tag 2) durch Analyse des entnommenen Augenblutes kontrolliert. Die aus dem Blut isolierten Lymphozyten anti-CD25-AK-behandelter Tiere zeigten zu beiden Zeitpunkten gegenüber den Kontrollen eine deutlich geringere Expression des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors FoxP3 (Abb.26C).

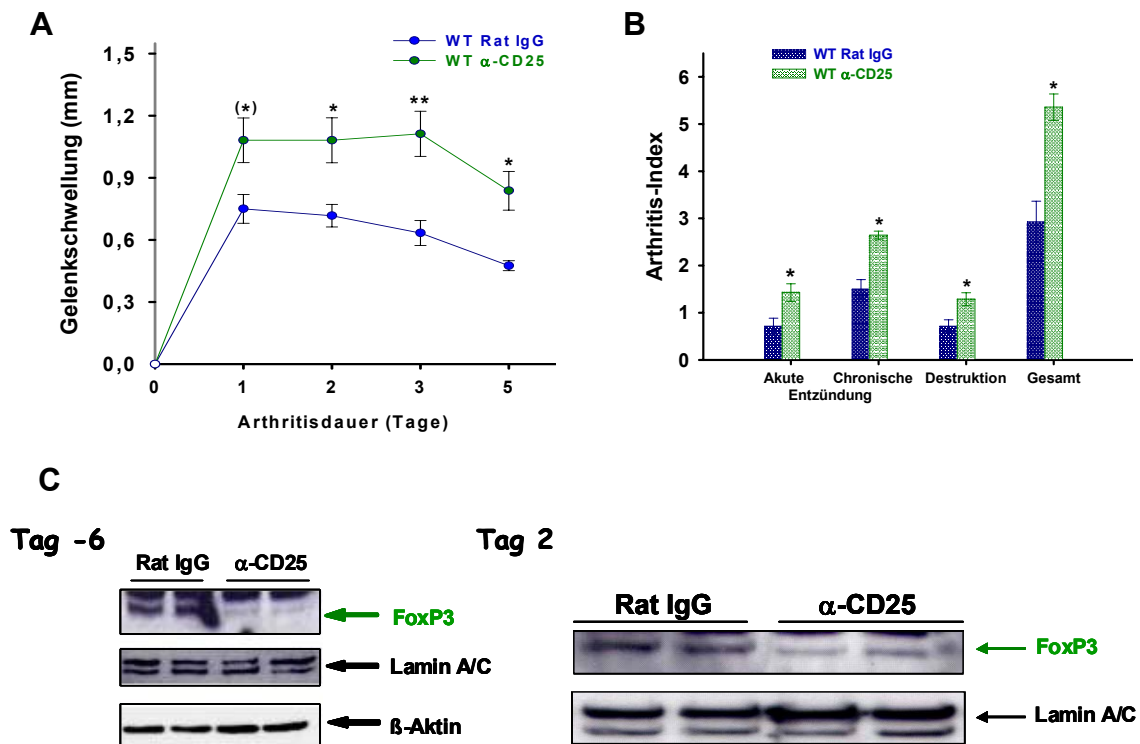


Abb.26 Klinische und histologische Parameter der AIA sowie Nachweis der Treg-Depletion. **A)** Die Messung der Kniegelenkschwellung erfolgte bei den mit Ratten IgG- bzw. anti-CD25-AK-behandelten C57Bl/6-Mäusen während der akuten Phase der AIA täglich. **B)** Die Bewertung der Entzündungs- und Destruktionsmerkmale wurde anhand des Arthritiscores (Tab.4) vorgenommen. Die Versuche wurden jeweils mit 12 Tieren pro Gruppe angesetzt. (*) p < 0,1; * p < 0,05; ** p < 0,01. **C)** Für den Nachweis der CD25-Depletion wurden an den Tagen -6 und 2 der AIA Lymphozyten über einen Ficoll-Gradienten aus Augenblut anti-CD25-behandelter Tiere und von Kontrollen separiert, lysiert und die Lysate anschließend im WB mit anti-FoxP3-AK analysiert. Als Ladekontrolle dienen Lamin A/C und β-Aktin.

4.4.1.2 Proliferationsrate und mRNA-Expressionsprofil von Milzzellen CD25-depletierter Tiere

mBSA- und anti-CD3/CD28-stimulierte Milzzellen CD25-depletierter Mäuse proliferierten stärker als die Zellen der entsprechenden Kontrolltiere (Abb.27A). Sowohl die mRNA-Spiegel des Th1- bzw. des Th17-Transkriptionsfaktors T-bet bzw. ROR γ t als auch die des Zytokins IL-17 sowie die der Th17- bzw. Th1-Differenzierungszytokine IL-22 und IL-23 bzw. IL-27 waren in polyklonal stimulierten Milzzellen CD25-depletierter Tiere signifikant erhöht (Abb.27B). Hingegen wurden geringere mRNA-Mengen des Th2-Transkriptionsfaktors GATA3 nachgewiesen (Abb.27B).

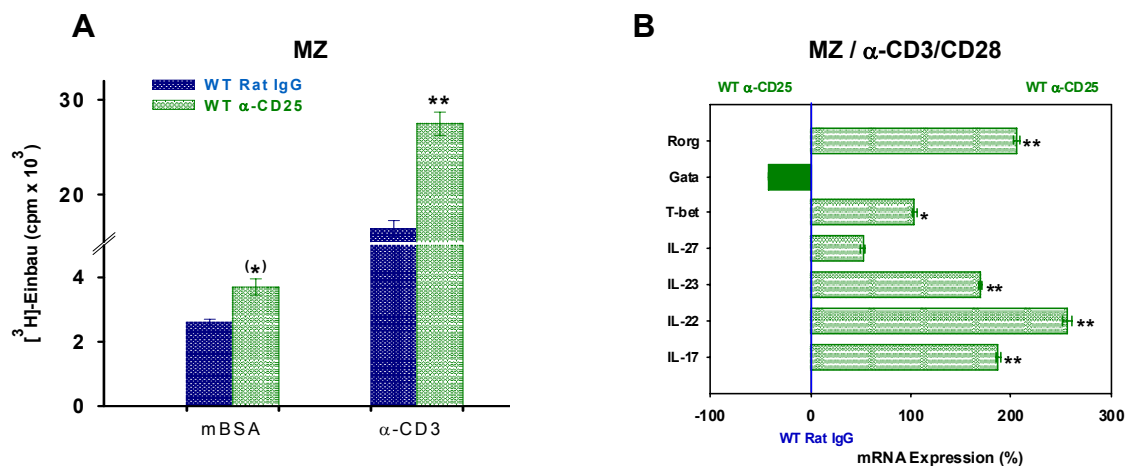
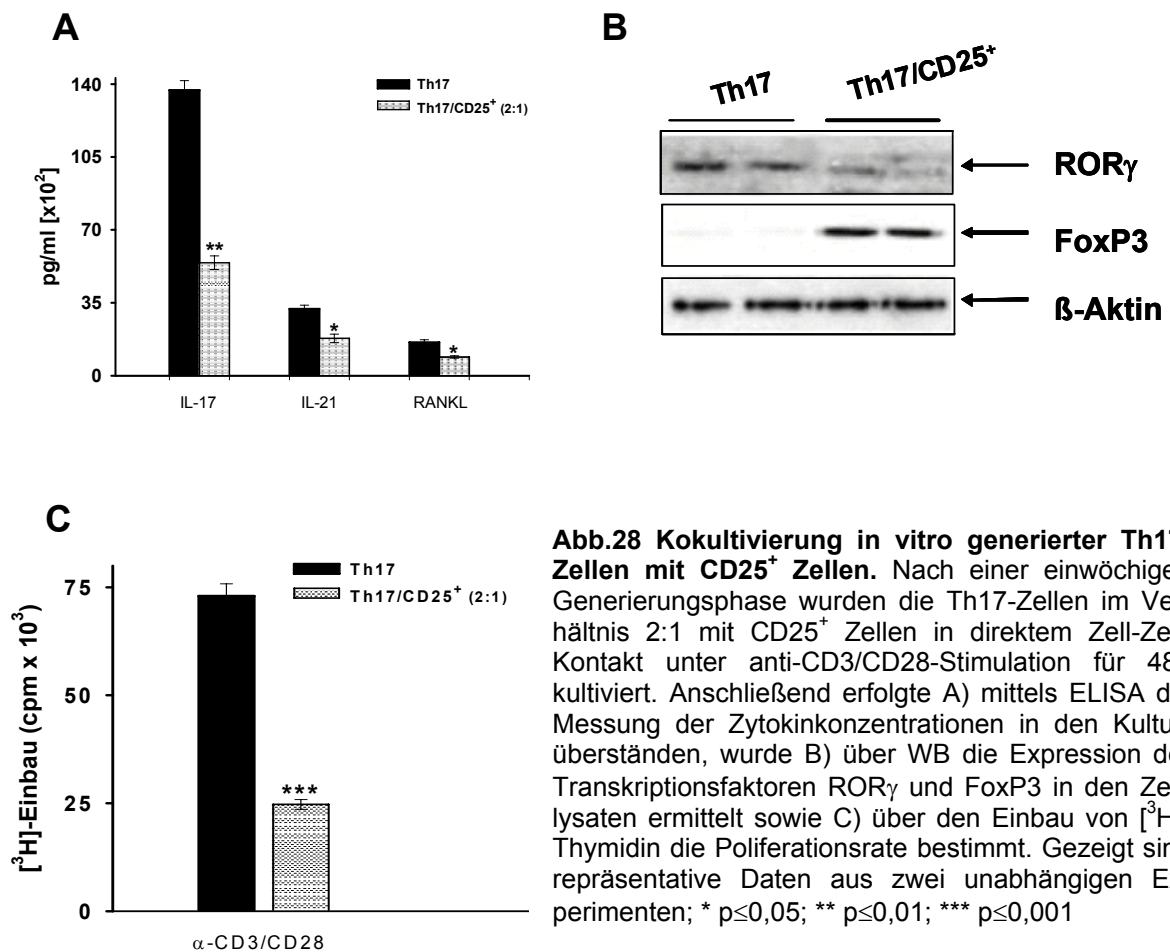


Abb.27 Bestimmung der Proliferation und mRNA-Expression. Am Tag 5 nach AIA-Induktion isolierte Milzzellen wurden wie angegeben mit mBSA oder anti-CD3/CD28-AK stimuliert und danach A) die [³H]-Thymidin-Einbauraten gemessen bzw. erfolgte B) die quantitative Bestimmung der mRNA-Expression. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus n=10 Tiere pro Gruppe für den Proliferationsassay bzw. n=6 Tiere pro Gruppe für die RT-PCR. (*) p≤0,1; * p≤0,05; ** p≤0,01 im Vergleich zur WT Rat IgG-Kontrolle.

4.4.2 Der Einfluss CD25⁺ Zellen auf in vitro generierter Th17-Zellen

Um eine funktionelle Bedeutung der regulatorischen T-Zellen speziell auf die Th17-Zellen nachzuweisen, erfolgte die Kultivierung der beiden Subpopulationen im direkten Zell-Zellkontakt.

Die direkte Kokultivierung *in vitro* generierter, anti-CD3/CD28-stimulierter Th17-Zellen mit CD25⁺ Zellen im Verhältnis 2:1 führte zu einer deutlich geringeren Produktion der typischen Th17-Zytokine IL-17 und IL-21 (Abb.28A). Des Weiteren unterdrückten CD25⁺ Zellen neben der Sekretion des Osteoklasten-Differenzierungsfaktors RANKL durch Th17-Zellen (Abb.28A) auch deren Expansion (Abb.28C). Der Hauptregulator des Th17-Differenzierungsprogramms ROR γ wurde in Kokultur mit CD25⁺ Zellen verringert exprimiert (Abb.28B).



4.4.3 Die Depletion CD25⁺ Zellen in IL-17-defizienten Mäusen

4.4.3.1 Klinische und histologische Parameter

Die bisherigen Ergebnisse deuten zum einen auf eine erhöhte Th17-Antwort in Treg-depletierten WT-Tieren hin, zum anderen zeigten IL-17-defiziente Mäuse einen deutlich milderen Verlauf der Arthritis. Um den Einfluss der veränderten Sekretion des proinflammatorischen IL-17 nach Treg-Depletion auf die AIA genauer zu definieren, wurden IL-17^{-/-} Tiere ebenfalls nach dem gleichen Zeit- und Dosierungsschema mit anti-CD25-AK behandelt (siehe Abb.7).

IL-17-defiziente Mäuse zeigten nach Injektion des anti-CD25-AK einen klinisch schwereren AIA-Verlauf als vergleichbare Ratten IgG-behandelte IL-17^{-/-} Kontrollen (Abb.29A). Der Krankheitsverlauf war dabei dem der CD25-depletierten WT-Tiere ähnlich. Die klinischen Befunde wurden histologisch durch die erhöhte akute und chronische Entzündung Treg-depletierter IL-17^{-/-} Tiere bestätigt (Abb.29B).

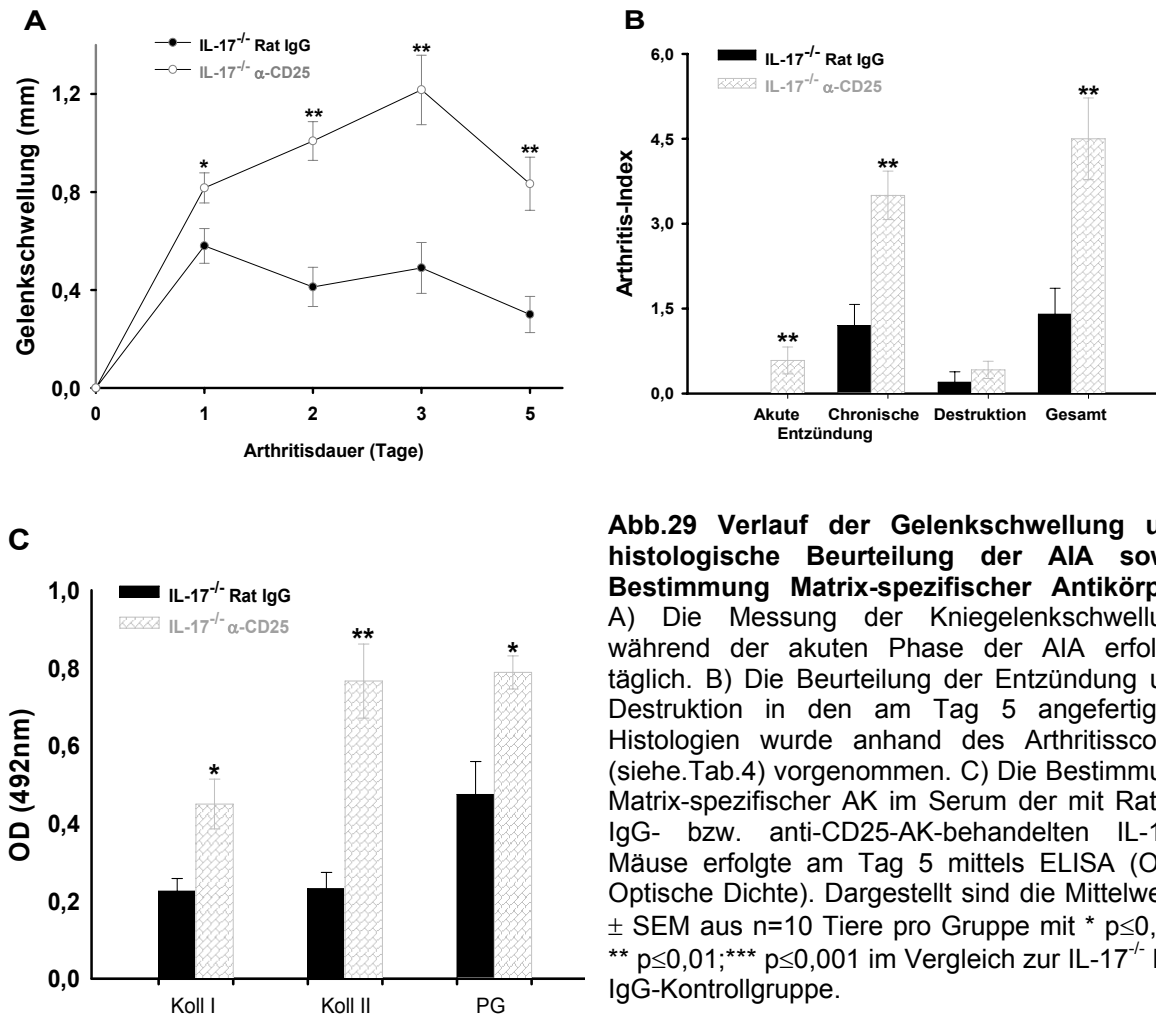
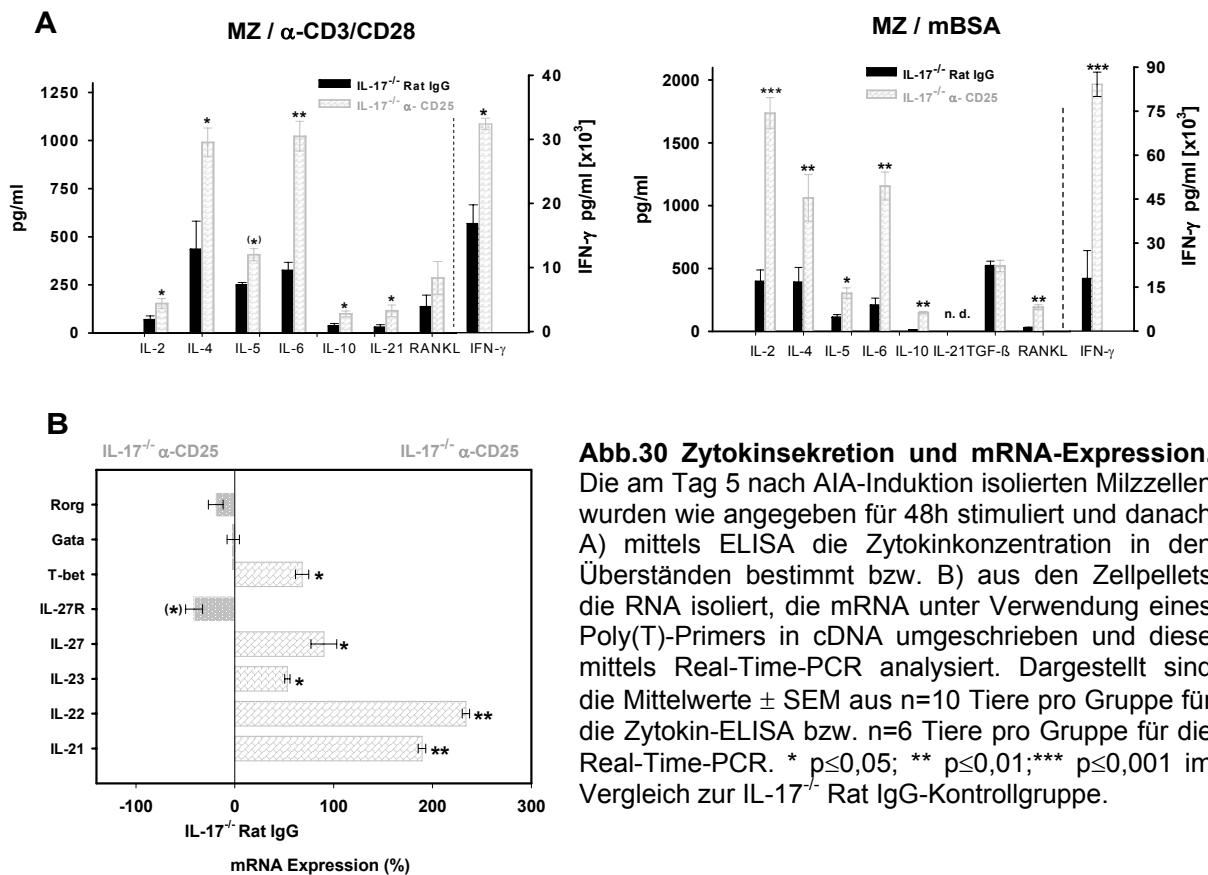


Abb.29 Verlauf der Gelenkschwellung und histologische Beurteilung der AIA sowie Bestimmung Matrix-spezifischer Antikörper. A) Die Messung der Kniegelenkschwellung während der akuten Phase der AIA erfolgte täglich. B) Die Beurteilung der Entzündung und Destruktion in den am Tag 5 angefertigten Histologien wurde anhand des Arthritiscores (siehe.Tab.4) vorgenommen. C) Die Bestimmung Matrix-spezifischer AK im Serum der mit Ratten IgG- bzw. anti-CD25-AK-behandelten IL-17^{-/-} Mäuse erfolgte am Tag 5 mittels ELISA (OD= Optische Dichte). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus n=10 Tiere pro Gruppe mit * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zur IL-17^{-/-} Rat IgG-Kontrollgruppe.

4.4.3.2 Zytokin-Expressionsprofil von Milzen und Bestimmung matrixspezifischer AK im Serum

Unabhängig von der Art der TZR-Stimulation wurde in den Milzzell-Überständen CD25-depletierter IL-17^{-/-} Tiere mit Ausnahme von TGF- β erhöhte Konzentrationen aller gemessenen Zytokine festgestellt (Abb.30A). Unter anderem wurden die Transkripte des Th1-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktors T-bet, der Th17-Differenzierungszytokine IL-21, IL-22 und IL-23 sowie des Th1-Differenzierungszytokins IL-27 durch anti-CD3/CD28-stimulierte Milzzellen Treg-depletierter IL-17^{-/-} Tiere verstärkt exprimiert (Abb.30B).

Die Konzentration Matrix-spezifischer AK gegen Kollagen Typ I/II sowie Proteoglykane war in den Seren CD25-depletierter IL-17^{-/-} Mäuse deutlich höher als in denen entsprechender Kontrollen (Abb.29C).



Zusammenfassung

Die Depletion CD25⁺ Zellen vor bzw. während der Immunisierungsphase führte zu einem klinisch schwereren Verlauf der AIA in WT-Tieren, der sich durch eine erhöhte akute und chronische Entzündung in den Histologien widerspiegelte (Abb.26A,B). Milzzellen Treg-depletierter WT-Mäuse exprimierten neben typischen Th17-Differenzierungszytokinen verstärkt das proinflammatorische Zytokin IL-17 (Abb.27B).

In vitro-Analysen mit generierten Th17-Zellen ergaben in Kokultur mit CD25⁺ Zellen sowohl eine potenzielle Reduzierung der Th17-Expansion und ROR γ -Expression sowie der Th17-abhängigen Zytokine IL-17, IL-21 und RANKL.

Interessanterweise konnte das Fehlen von IL-17 den krankheitsverstärkenden Effekt einer CD25-Depletion nicht verhindern (Abb.29). Die Untersuchung TZR-stimulierter Milzzellen Treg-depletierter IL-17^{-/-} Tiere ergab eine erhöhte Expression nahezu aller gemessenen Zytokine (Abb.30).

4.5 Die Depletion $CD4^+$ Zellen in IL-17-defizienten Mäusen

4.5.1 Klinische und histologische Parameter

Die Veränderung des Kniegelenkdurchmessers wurde bei den mit anti-CD4-AK-behandelten IL-17^{-/-} Mäusen und den entsprechenden Ratten IgG-Kontrollen an den ersten drei Tagen der akuten Phase der Arthritis erfasst.

Depletiert man kurz vor Arthritisinduktion $CD4^+$ Zellen in IL-17^{-/-} Mäusen, führt dies zu einer weiteren, signifikant schwächeren Ausprägung der Gelenkschwellung in der akuten Phase der AIA (Abb.31A). Dabei nahm die Ansammlung von Entzündungszellen im Gelenkspalt CD4-depletierter Tiere im Vergleich zu den Ratten IgG-behandelten IL-17^{-/-} Kontrollen nochmals ab (Abb.31B).

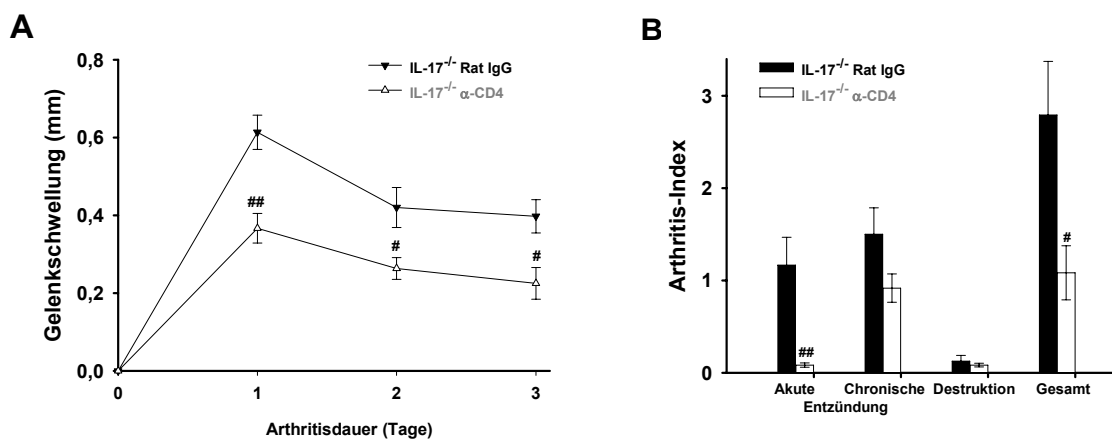


Abb.31 Verlauf der Kniegelenkschwellung und histologische Beurteilung der AIA CD4-depletierter IL-17^{-/-} Mäuse. A) Die Gelenkschwellung von anti-CD4-AK- und Ratten IgG-behandelter IL-17-defizienter Tiere wurde an den Tagen 1, 2 und 3 nach Arthritisinduktion gemessen. B) Die Bewertung der histologischen Präparate wurde anhand des Arthritiscores (Tab.4) durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM einer repräsentativen Kurzzeitstudie mit n=10 Tiere pro Gruppe mit # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$ im Vergleich zur IL-17^{-/-} Rat IgG-Kontrollegruppe.

4.5.2 Immunologische Parameter der AIA

4.5.2.1 Proliferationsassay

Die Depletion $CD4^+$ Zellen in IL-17^{-/-} Mäusen an den Tagen -7 und -3 vor Arthritisinduktion (siehe Zeitschema Abb.7) führte organ- und stimulationsunabhängig zu einer starken Reduktion der Zellproliferation (Abb.32)

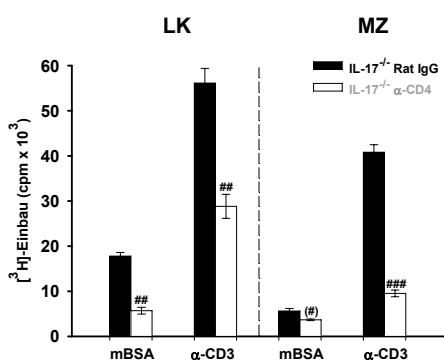


Abb.32 Proliferationsassay. Verwendet wurden Lymphknoten- und Milzzellsuspensionen am Tag 3 nach AIA-Induktion, die aus anti-CD4-AK- bzw. Ratten IgG-behandelten IL-17^{-/-} Mäusen mit mBSA und anti-CD3/CD28-AK für 42h stimuliert und für weitere 18h mit [³H]-Thymidin inkubiert wurden. Die Messung der [³H]-Thymidin-Einbaurrate erfolgte mittels Top-Counter. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus n=10 Tiere pro Gruppe mit * $p \leq 0,05$ im Vergleich zur IL-17^{-/-} Rat IgG-Kontrollgruppe.

Zusammenfassung

Die reduzierte Immunantwort infolge einer CD4-Depletion führte bei IL-17^{-/-}-Tieren zu einer weiteren Verringerung der Schwere des AIA-Verlaufs (Abb.31, 32).

4.6 Der Einfluss von IFN- γ auf die AIA in IL-17-defizienten Mäusen

Wie bereits gezeigt, führte der Mangel bzw. das vollständige Fehlen von IFN- γ zu einer dramatischen Verschlimmerung der akuten Phase der AIA (Abb.10). Auffallend war hierbei die verstärkte Expression von IL-17 sowie weiterer, mit der Th17-Subpopulation assoziierter Zytokine in Milzen und Lymphknoten von Tieren mit IFN- γ -Mangel (Abb.12). Im Gegenzug führte das Fehlen von IL-17 zu einem milderen Verlauf der AIA (Abb.21). Um weitere Erkenntnisse über das Zusammenspiel von IL-17 und IFN- γ in der AIA zu erlangen, wurden IL-17^{-/-} Mäuse mit einem neutralisierenden anti-IFN- γ -AK behandelt. Außerdem wurden Tiere gezüchtet, die für IL-17 und IFN- γ doppel-defizient (IL-17^{-/-} IFN- γ ^{-/-}) waren.

4.6.1 Klinischer Verlauf der AIA und Konzentration matrixspezifischer AK im Serum

Sowohl die mit anti-IFN- γ -AK-behandelten IL-17^{-/-} Mäuse als auch die IL-17-/IFN- γ -defizienten Tiere reagierten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen, d.h. Ratten IgG-behandelten IL-17^{-/-} bzw. Wildtyp-Tieren, nach intraartikulärer Antigenapplikation mit einer verstärkten Gelenkschwellung (Abb.33A). In Übereinstimmung mit dem klinischen Verlauf fanden sich in den Seren der Tiergruppen mit IFN- γ -Mangel erhöhte Auto-AK-Mengen gegen die im arthritischen Kniegelenk freigesetzten Kollagene Typ I und II sowie Proteoglykane (Abb.33B).

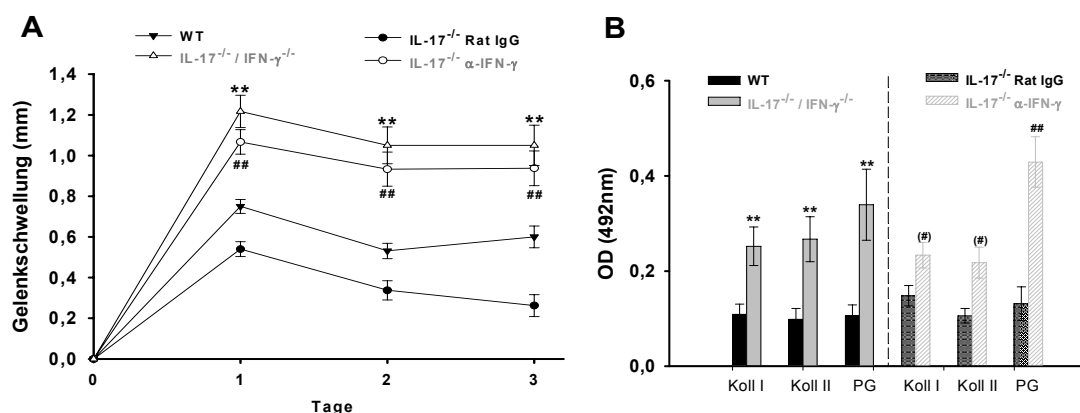


Abb.33 Verlauf der Kniegelenkschwellung bei der AIA sowie Bestimmung matrixspezifischer Antikörper im Serum. A) Die Messung der Kniegelenkschwellung erfolgte während der akuten Phase der AIA. B) Die Bestimmung matrixspezifischer AK im Serum erfolgte am Tag 3 der AIA mittels ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus n=8-10 Tiere pro Gruppe mit (#) p<0,1; **,### p<0,01 im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe.

4.6.2 Immunologische Parameter der AIA

4.6.2.1 Proliferation und Zytokinbestimmung in Zellkulturüberständen

Die Milzzellen anti-IFN- γ -behandelter IL-17^{-/-} Mäuse produzierten auch bei weiterer *in vitro*-Hemmung von IFN- γ mit Ausnahme vom TGF- β erhöhte Mengen aller gemessenen Zytokine (Abb.34B) und expandierten nach TZR-Stimulation stärker als die Zellen der Rat IgG-behandelten Kontrollen (Abb.34A).

Noch ausgeprägtere Unterschiede waren im Vergleich von Wildtyp und IL-17-/IFN- γ -defizienten Tieren feststellbar. Organ-unabhängig wurde in den Kulturüberständen sowohl polykonal als auch Antigen-spezifisch stimulierter Zellen doppelt-defizienter Mäuse eine erhöhte Konzentration der Mehrzahl der analysierten Zytokine detektiert mit Ausnahme von IL-17 und IFN- γ (Abb.35A). mBSA-stimulierte IL-17^{-/-}IFN- γ ^{-/-} LK- und Milzzellen proliferierten stärker als die vergleichbaren WT-Zellen (Abb.35B).

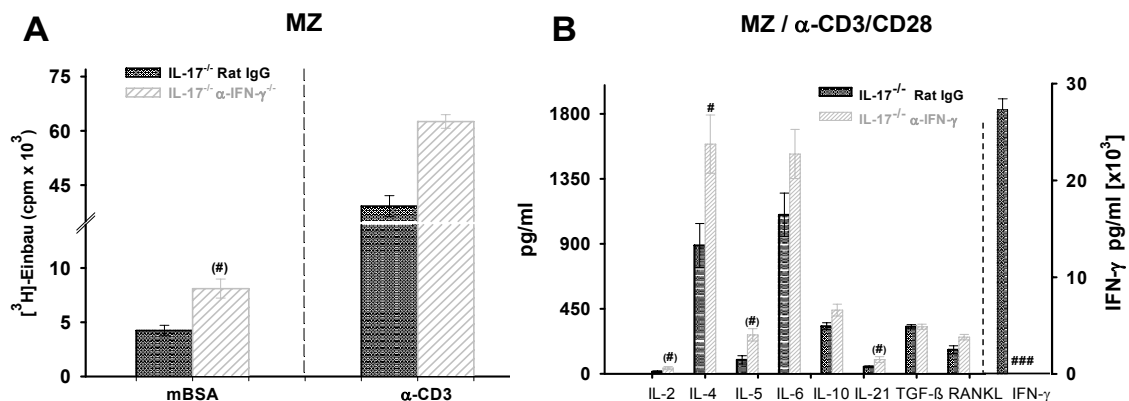
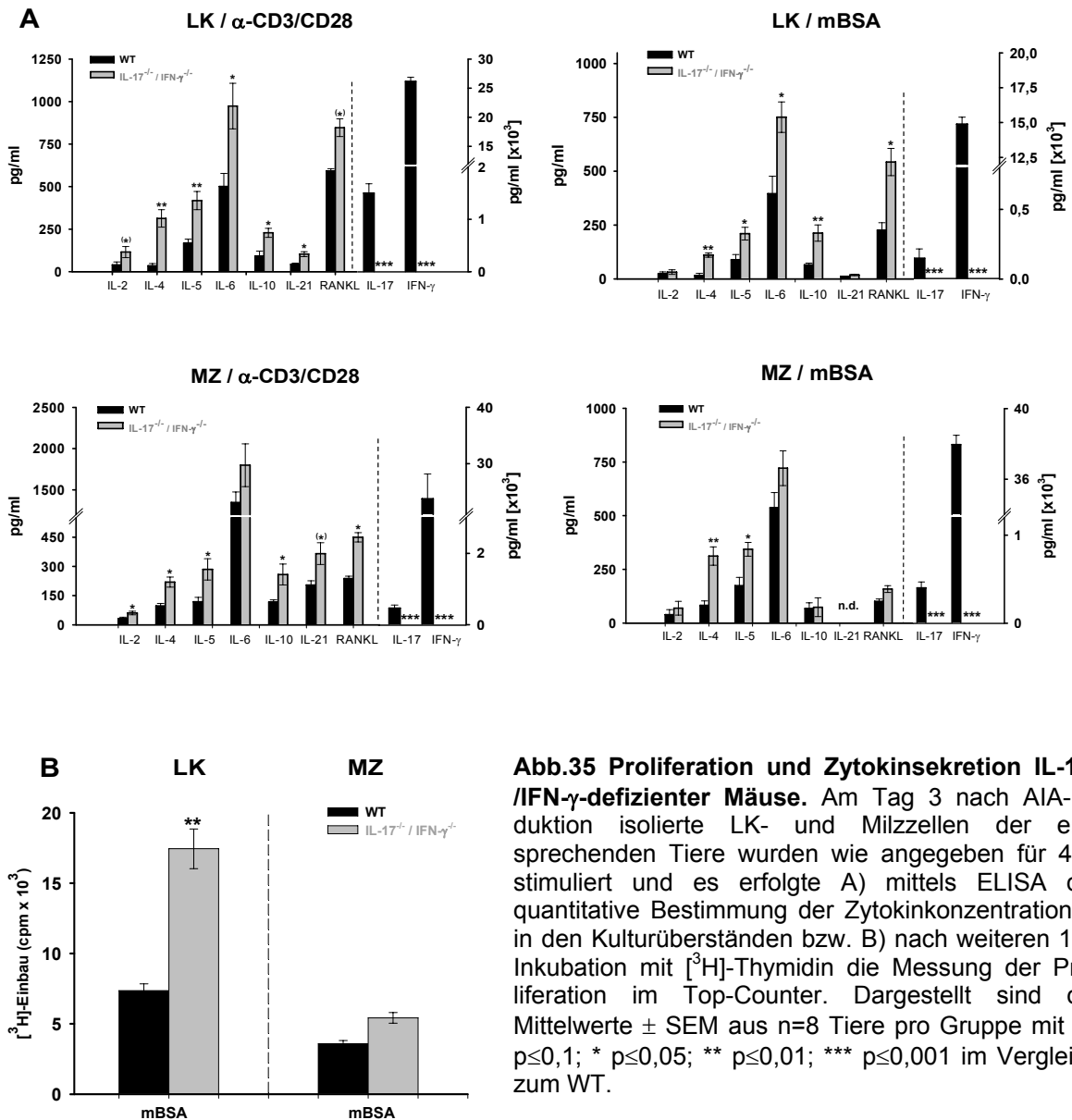


Abb.34 Proliferation und Zytokinsekretion Rat IgG- bzw. anti-IFN- γ -AK-behandelter IL-17^{-/-} Mäuse. Am Tag 3 nach AIA-Induktion isolierte Milzzellen der entsprechenden Tiere wurden für 48h mit anti-CD3/CD28-AK oder mBSA stimuliert und es erfolgte A) nach weiteren 18h Inkubation mit [³H]-Thymidin die Messung der Proliferation mittels Top-Counter bzw. B) über ELISA die quantitative Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in den Kulturüberständen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus n=10 Tiere pro Gruppe mit (#) p \leq 0,1; # p \leq 0,05; ## p \leq 0,01; ### p \leq 0,001 im Vergleich zur IL-17^{-/-} Rat IgG-Kontrollgruppe.



4.6.2.2 Th-Zell-spezifische Eigenschaften der IL-17-/IFN- γ -defizienten Maus

Antigen-spezifisch stimulierte LK-Zellen IL-17 $^{-/-}$ IFN- γ $^{-/-}$ Tiere exprimierten geringere mRNA-Mengen des IFN- γ -abhängigen Th1-spezifischen Transkriptionsfaktors T-bet (Abb.36A). Hingegen wurden im Vergleich zum WT in den Lymphknoten doppelt-defizienter Tiere unter anderem die mRNAs der Schlüsselfaktoren des Th17- bzw. Th2-Expressionsprogramms ROR γ t und GATA3 verstärkt gebildet (Abb.36A). Übereinstimmend mit den Real-Time-PCR-Ergebnissen war T-bet auf Proteinebene in mBSA-stimulierten IL-17 $^{-/-}$ IFN- γ $^{-/-}$ Zelllysaten kaum nachweisbar (Abb.36B). Ähnlich schwach wurde im Vergleich zum WT auch der Regulatoren-Transkriptions-faktor FoxP3 exprimiert (Abb.36B).

Analog zu IFN- γ $^{-/-}$ bzw. IL-17 $^{-/-}$ Tieren (Abb.16A; Abb.24A) konnte nach AIA-Induktion in den Milzen IL-17-/IFN- γ -defizienter Mäuse im Vergleich zum WT ein stärkerer

Anstieg der Anzahl $CD4^+$ sowie $CD8^+$ Zellen verzeichnet werden (Abb.36C). Dagegen wurde zum gleichen Zeitpunkt eine geringere Zahl $FoxP3^+$ $IL-17^{-/-}$ $IFN-\gamma^{-/-}$ Milzzellen detektiert (Abb.36C).

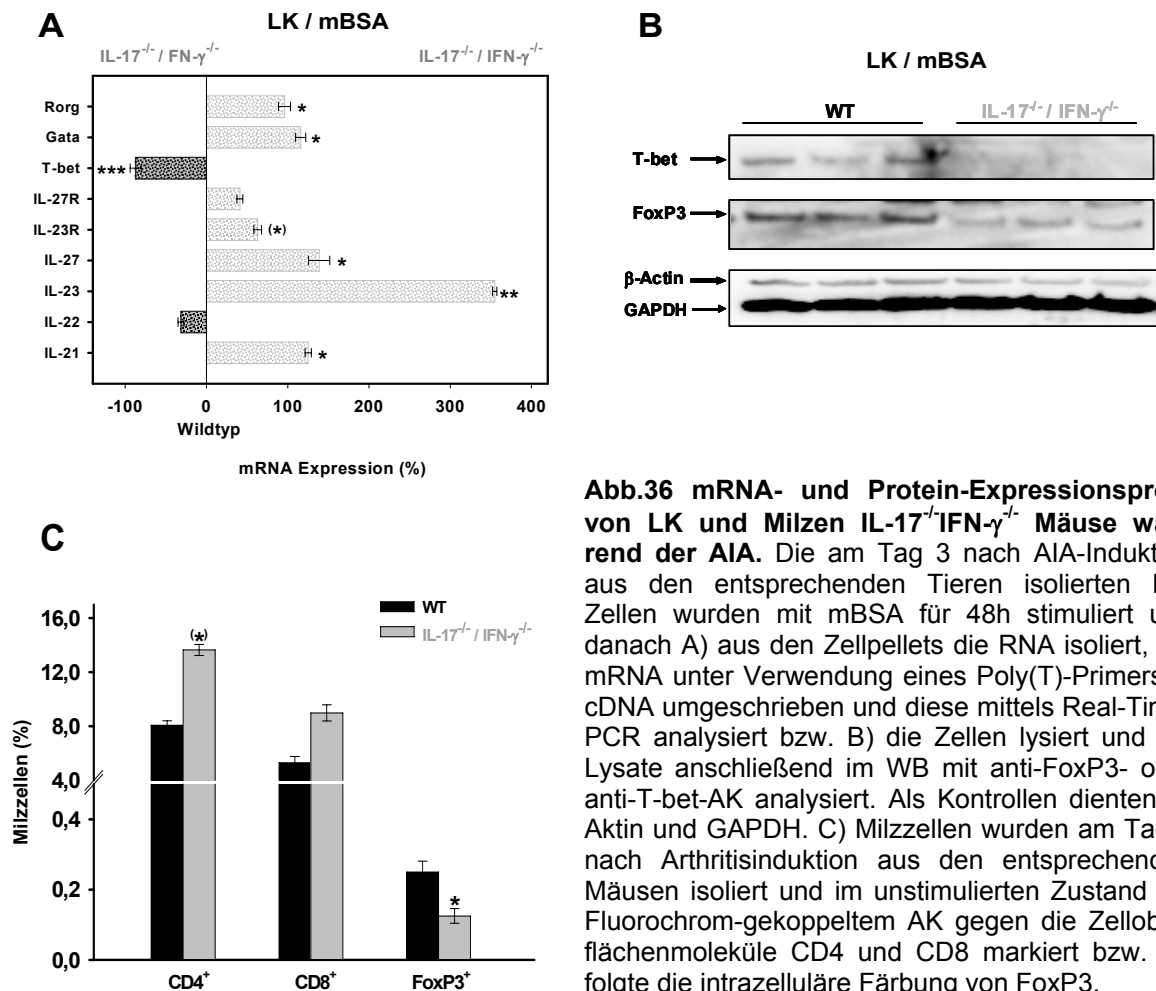


Abb.36 mRNA- und Protein-Expressionsprofil von LK und Milzen $IL-17^{-/-}$ $IFN-\gamma^{-/-}$ Mäuse während der AIA. Die am Tag 3 nach AIA-Induktion aus den entsprechenden Tieren isolierten LK-Zellen wurden mit mBSA für 48h stimuliert und danach A) aus den Zellpellets die RNA isoliert, die mRNA unter Verwendung eines Poly(T)-Primers in cDNA umgeschrieben und diese mittels Real-Time-PCR analysiert bzw. B) die Zellen lysiert und die Lysate anschließend im WB mit anti-FoxP3- oder anti-T-bet-AK analysiert. Als Kontrollen dienten β -Aktin und GAPDH. C) Milzzellen wurden am Tag 1 nach Arthritisinduktion aus den entsprechenden Mäusen isoliert und im unstimulierten Zustand mit Fluorochrom-gekoppeltem AK gegen die Zelloberflächenmoleküle CD4 und CD8 markiert bzw. erfolgte die intrazelluläre Färbung von FoxP3. (*) $p \leq 0,1$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Zusammenfassung

Der Mangel bzw. das komplette Fehlen von $IFN-\gamma$ führte auch bei einer Defizienz für das proinflammatorische Zytokin $IL-17$ zu einer deutlichen Verschlimmerung der Arthritis (Abb.33). In der akuten Phase der AIA zeichneten sich LK und Milzen $IL-17^{-/-}$ $IFN-\gamma^{-/-}$ Tiere im Vergleich zum Wildtyp durch eine erhöhte Zytokinproduktion aus (Abb.35A). Auffallend gering bzw. nahezu nicht detektierbar war die Expression des Th1-typischen Transkriptionsfaktors T-bet bei $IL-17^{-/-}$ $IFN-\gamma^{-/-}$ Defizienz (Abb.36A). Weitere Kennzeichen arthritischer $IL-17^{-/-}$ $IFN-\gamma^{-/-}$ Tiere waren die verringerten Mengen des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors FoxP3 in Lymphknoten (Abb.36B) sowie eine reduzierte Zahl $FoxP3^+$ Milzzellen (Abb.36C). Letztendlich konnte der schwerere AIA-Verlauf, hervorgerufen durch den Verlust von

IFN- γ , über den gleichzeitigen Wegfall des Entzündungsmediators IL-17 in der für beide Zytokine defizienten Maus nicht kompensiert werden.

4.7 Modulation der Synoviozytenaktivität bei sich veränderten Zytokinmuster

4.7.1 Die Rolle von IFN- γ und IL-17 bei der Aktivierung synovialer Fibroblasten

Um Rückschlüsse auf eine pro- und/oder anti-inflammatorische Wirkung von IFN- γ bzw. IL-17 zu ziehen und somit deren Stellenwert für das Entzündungs- und Destruktionsgeschehen im arthritischen Kniegelenk abschätzen zu können, wurden primäre synoviale Fibroblasten naiver Wildtyp-Tiere isoliert und mit AIA-Milzzell-suspensionen verschiedener Zytokin-defizienter Mausstämmen bzw. des Wildtyps im direkten (Zell-Zellkontakt) und indirekten (Transwell) Kontakt kokultiviert. Im Anschluss wurde die Sezernierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) durch die synovialen Fibroblasten (FLS), deren Aktivität (MMP-Aktivitäts-Assay; Zymographie) sowie das Verhältnis der mRNA-Expression (Real-Time-PCR) zwischen TIMPs und MMPs analysiert.

4.7.1.1 Bestimmung der MMP-Gesamtaktivität

Als Maß für die MMP-Gesamtaktivität wurde der Umsatz von Peptid 1 (siehe Methoden 3.2.11) angesehen, da dieses unspezifisch von der Mehrzahl der von FLS sekretierten MMPs abgebaut werden kann. In Fibroblasten-Überständen, die mit AIA-IFN- $\gamma^{-/-}$ Milzzellen kokultiviert wurden, war im Vergleich zu den Kulturen mit WT-Milzzellen bzw. mit reinen Fibroblasten ein erhöhter Gehalt an aktiven MMPs detektierbar (Abb.37). Dieses Ergebnis zeigte sich unabhängig von der Art der Kokultur und der jeweiligen Stimulation (Abb.37). Hingegen produzierten FLS, die im direkten oder indirekten Kontakt mit arthritischen IL-17 $^{-/-}$ Milzzellen standen, deutlich geringere Mengen aktiver MMPs als vergleichbare Kulturen mit AIA-WT-Milzzellen (Abb.37).

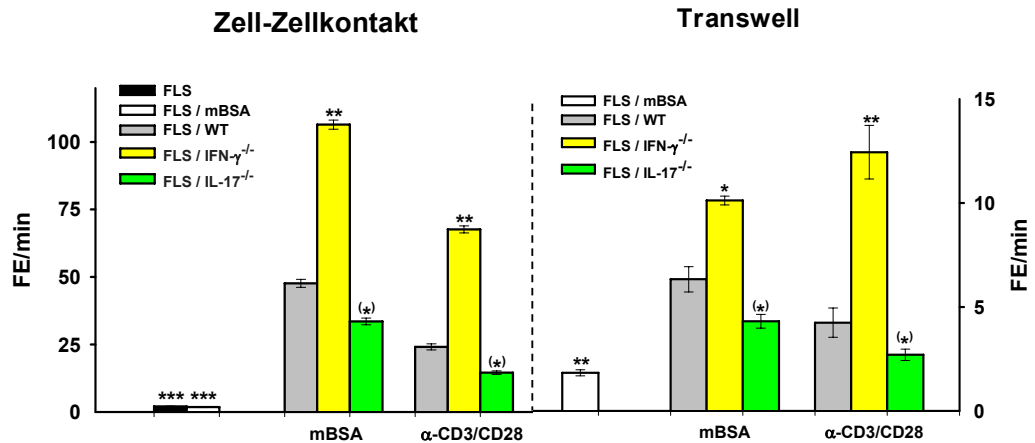


Abb.37 Bestimmung der MMP-Gesamtaktivität in Kokultur-Überständen synovialer Fibroblasten und Milzzellen. Naive primäre FLS wurden für 36h im direkten Zell-Zellkontakt bzw. für 48h indirekt über Membraneinsätze mit mBSA- oder anti-CD3/CD28-stimulierten Milzzellen arthritischer WT-, IFN- $\gamma^{-/-}$ oder IL-17 $^{-/-}$ Tiere in 12-Well-Platten kokultiviert. Die MMP-Gesamtaktivität der gesammelten Kokulturüberstände wurde über den Umsatz von Peptid 1 mittels Fluorometer bestimmt (FE= Fluoreszenz Einheit). Als Negativkontrollen dienten die Überstände mBSA-stimulierter bzw. unstimulierter FLS. Bezugspunkt der dargestellten Signifikanzen sind die Überstände der Kokulturen von FLS mit WT-Milzzellen mit * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Gezeigt sind repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Experimenten.

4.7.1.2 Bestimmung der Aktivität von MMP-3 und MMP-9

Als Substrat dieses Aktivitätsassays diente Peptid 2 (siehe Methoden 3.2.11), welches spezifisch von MMP-3 und MMP-9 umgesetzt wird. Analog zu den Untersuchungen der MMP-Gesamtaktivität stimulierten IFN- $\gamma^{-/-}$ Milzzellen die Freisetzung von aktiver MMP-3 und MMP-9 durch Fibroblasten am stärksten (Abb.38). Hingegen war der Gehalt an MMP-3 und MMP-9 in Fibroblasten-Überständen (stimulationsunabhängig) nach Kokultivierung mit arthritischen IL-17 $^{-/-}$ Milzzellen geringer als mit AIA-WT-Milzzellen (Abb.38).

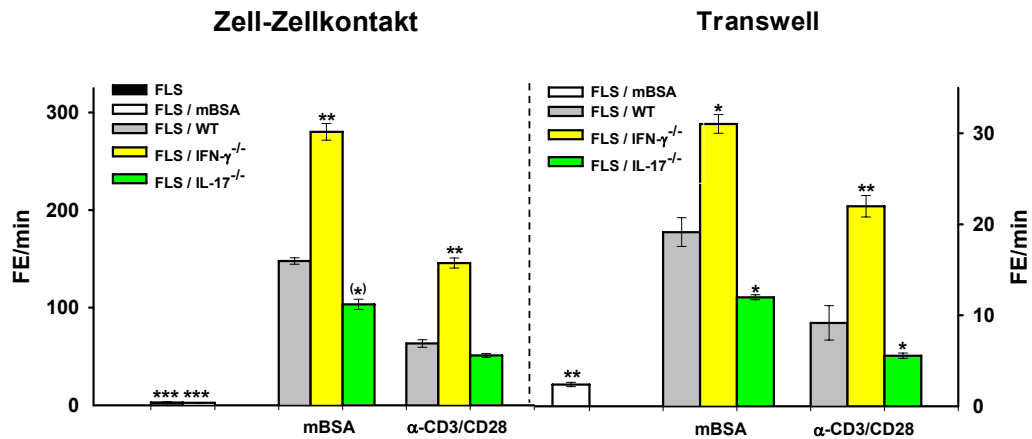


Abb.38 Bestimmung der Aktivität von MMP-3 und MMP-9 in Kokultur-Überständen synovialer Fibroblasten und Milzzellen. Naive primäre FLS wurden für 36h im direkten Zell-Zellkontakt bzw. für 48h indirekt über Membraneinsätze mit mBSA- oder α -CD3/CD28-AK-stimulierten Milzzellen arthritischer WT-, IFN- $\gamma^{-/-}$ oder IL-17 $^{-/-}$ Tiere in 12-Well-Platten kokultiviert. Die Aktivität von MMP-3 und MMP-9 in den Kokulturüberständen wurde über den Umsatz von Peptid 2 mittels Fluorometer bestimmt. Als Negativkontrollen dienten die Überstände mBSA-stimulierter bzw. unstimulierter FLS. Bezugspunkt der dargestellten Signifikanzen sind die Überstände der Kokulturen von FLS mit WT-Milzzellen mit * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Gezeigt sind repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Experimenten.

4.7.1.3 Zymographischer Nachweis der MMP-9-Aktivität

Bei der Zymographie wurde die Eigenschaft von MMP-9 genutzt, bevorzugt Gelatine zu verdauen. Konform mit den Ergebnissen des Aktivitätsssays zeichneten sich Fibroblasten, die mit IFN- γ -defizienten arthritischen-Milzzellen in direktem oder indirektem Kontakt standen, durch die stärkste Produktion von aktiver MMP-9 aus (Abb.39). Dagegen war der Gelatineverdau durch Kokultur-Überstände von FLS und arthritischen IL-17 $^{-/-}$ Milzzellen sehr schwach bzw. bei indirektem Zell-Kontakt nicht mehr detektierbar (Abb.39).

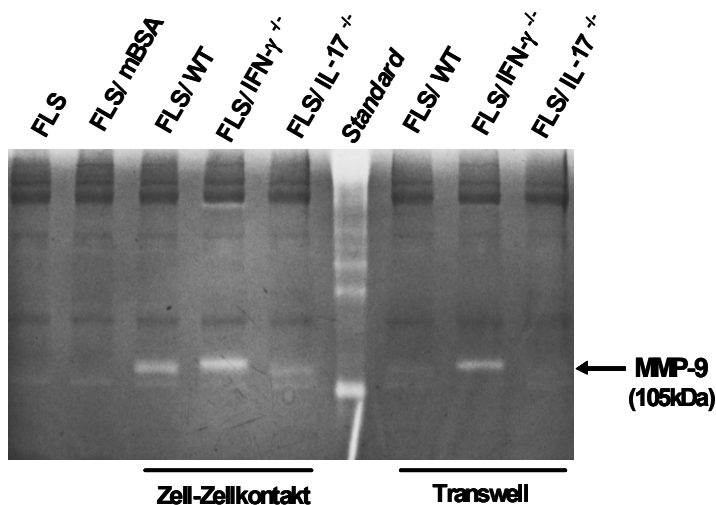


Abb.39 Gelatine-Zymographie von Kokultur-Überständen synovialer Fibroblasten und Milzzellen. Naive primäre FLS wurden für 36h im direkten Zell-Zellkontakt bzw. für 48h indirekt über Membraneinsätze mit mBSA-stimulierten Milzzellen arthritischer WT-, IFN- $\gamma^{-/-}$ oder IL-17 $^{-/-}$ Tiere in 12-Well-Platten kokultiviert. Die MMP-9-Aktivität in den Kokulturüberständen wurde zymographisch mittels Gelatineverdau visualisiert. Als Marker wurde ein humaner MMP-9-Standard mitgeführt.

4.7.1.4 TIMP- und MMP-Expressions (Transkriptions) profile

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden primäre Fibroblasten mit arthritischen $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$, $\text{IL-17}^{-/-}$ bzw. WT-Milzzellen stimuliert und im Anschluss mittels Real-Time-PCR die Transkriptionsraten verschiedener MMPs sowie die der endogenen Inhibitoren (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs)) bestimmt.

Das Fehlen von $\text{IFN-}\gamma$ führte zu einer signifikant höheren mRNA-Expression aller untersuchten MMPs sowie einer geringeren TIMP-Expression durch Fibroblasten (Abb.40). Spiegelbildlich verhielten sich Fibroblasten, die mit AIA- $\text{IL-17}^{-/-}$ Milzzellen kokultiviert wurden. Sie transkribierten deutlich geringere MMP-Mengen, im Gegenzug allerdings mehr TIMP-mRNA (Abb.40). Der Osteoklastogenese- und somit Knochendestruktions-fördernde RANK-Ligand (receptor activator of $\text{NF-}\kappa\text{B}$) wurde verstärkt durch Fibroblasten unter $\text{IFN-}\gamma$ -Mangel exprimiert (Abb.40). Hingegen verringerte das Fehlen von IL-17 die RANKL-Produktion in Fibroblasten (Abb.40).

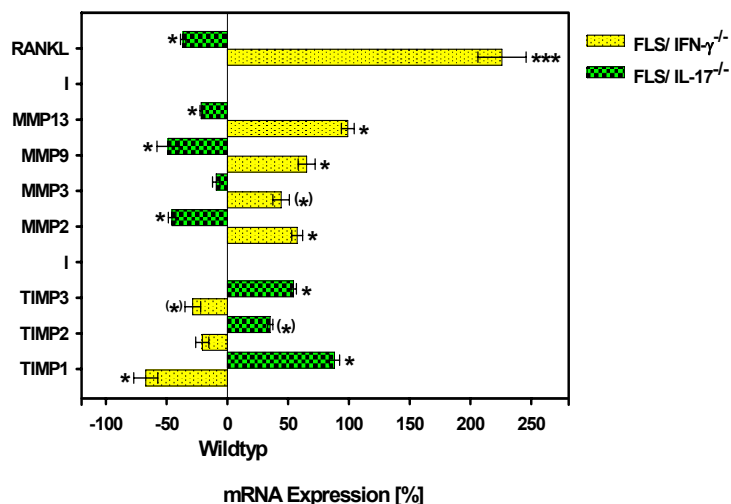


Abb.40 mRNA-Expression von MMPs, TIMPs und RANKL in aktivierten FLS. Naive primäre FLS wurden für 36h im direkten Zell-Zellkontakt mit mBSA-stimulierten Milzzellen arthritischer WT-, $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ oder $\text{IL-17}^{-/-}$ Tiere in 12-Well-Platten kokultiviert. Aus den abgetrennten Fibroblasten wurde die RNA isoliert, die mRNA unter Verwendung eines Poly(T)-Primers in cDNA umgeschrieben und diese mittels Real-Time-PCR analysiert. Bezugspunkt der dargestellten Signifikanzen sind FLS, die mit AIA-WT-Milzzellen kokultiviert wurden, mit (*) $p \leq 0,1$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Gezeigt sind repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Experimenten.

4.7.1.5 Bestimmung von Zytokinen in Kokulturüberständen

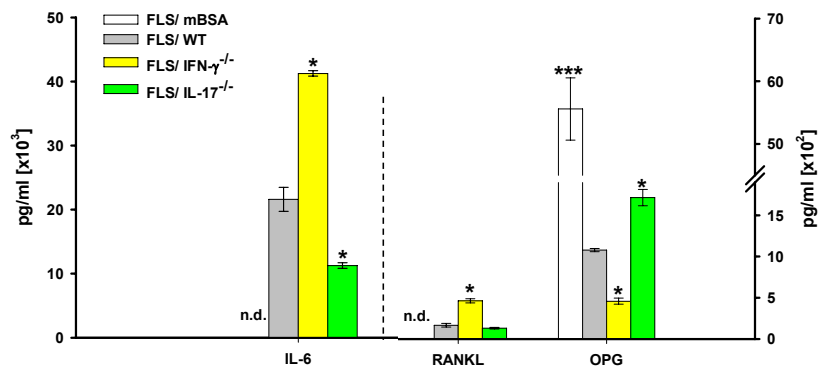
Um die Bedeutung von $\text{IFN-}\gamma$ und IL-17 für das Entzündungs- und Destruktionsgeschehen im arthritischen Kniegelenk weiter einzugrenzen, wurde die Sekretion der an diesen Prozessen beteiligten Schlüsselzytokine IL-6, RANKL und Osteoprotegerin (OPG) in den entsprechenden Überständen von FLS/Milzzell-Kokulturen bestimmt.

Die Kokultivierung von Fibroblasten mit arthritischen Milzzellen $\text{IFN-}\gamma$ -defizienter Tiere führte zu einer verstärkten Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-6 sowie von RANKL (Abb.41). Die Konzentration von OPG, das durch Bindung von RANK-Ligand die Osteoklastenbildung verhindern kann, war in diesen Überständen

deutlich geringer als in denen vergleichbarer Kontrollen (Abb.41). In Fibroblasten/IL-17^{-/-}-Milzzell-Kokulturen wurde im Vergleich zu den Kontrollüberständen eine deutlich schwächere IL-6- und RANKL-Produktion detektiert (Abb.41). Im Gegenzug stieg bei Fehlen von IL-17 die OPG-Konzentration in den Überständen an (Abb.41).

Abb.41 Zytokinbestimmung in Kokultur-Überständen.

Naive primäre FLS wurden für 36h im direkten Zell-Zellkontakt mit mBSA-stimulierten Milzzellen arthritischer WT-, IFN- γ ^{-/-} oder IL-17^{-/-} Tiere in 12-Well-Platten kokultiviert. Mittels ELISA wurden die Konzentration ausgewählter Zytokine, die im direkten Bezug zur Knochendestruktion stehen, bestimmt. Bezugspunkt der dargestellten Signifikanzen sind die Überstände der Kokulturen von FLS mit AIA-WT-Milzzellen mit * p \leq 0,05; ** p \leq 0,01; *** p \leq 0,001. Gezeigt sind repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Experimenten.



Zusammenfassung

Bei der Kokultivierung von Fibroblasten mit arthritischen Milzzellen IFN- γ -defizienter Tiere kam es unabhängig von der Art des Zellkontaktes und der Stimulation zu einer verstärkten Bildung von MMP-2, -3, -9, und -13 (Abb.40) und zeitgleich zu einer reduzierten Expression von TIMP1, 2 und 3 (Abb.40). Des Weiteren zeichneten sich Kokultur-Überstände bei IFN- γ -Mangel durch erhöhte Konzentrationen der Entzündungs- und Destruktions-vermittelnden Zytokine IL-6 und RANKL aus (Abb.41). Ohne IL-17 ließen sich Fibroblasten nur geringfügig zur Sekretion aktiver MMPs stimulieren (Abb.37, 38, 39), produzierten aber vermehrt die MMP-Inhibitoren TIMP 1, 2 und 3 sowie den RANKL-Antagonisten OPG (Abb.40, 41).

4.7.2 Die Aktivierung synovialer Fibroblasten bei fehlender IL-17-/IFN- γ -Stimulation

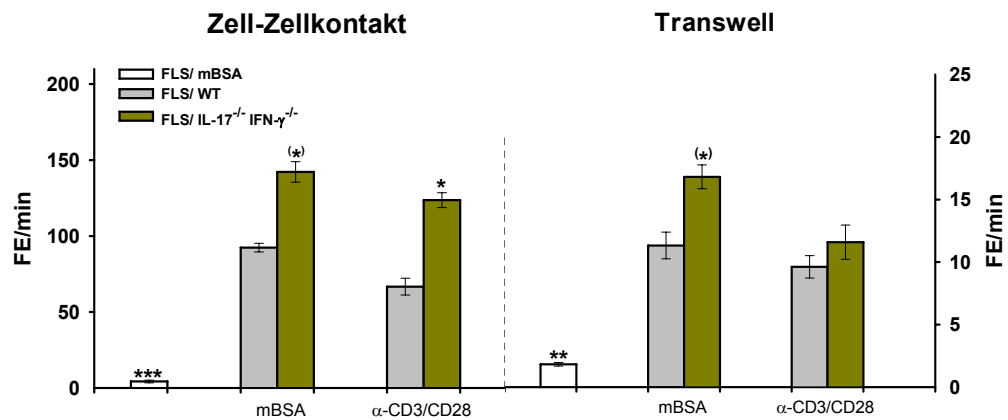
4.7.2.1 Bestimmung der MMP-Gesamtaktivität

Mit Hilfe von arthritischen Milzzellen, die sowohl für IFN- γ als auch für IL-17 defizient waren, wurde die Auswirkung des simultanen Verlustes beider Zytokine auf die Fibroblasten-Aktivierung untersucht.

Trotz des nahezu gegenteiligen Effektes, den IFN- γ ^{-/-} bzw. IL-17^{-/-} Milzzellen auf die Sezernierung aktiver MMPs durch Fibroblasten (Abb.37, 38, 39) zeigten, stimulierten AIA-IFN- γ ^{-/-} Milzzellen, die kein IL-17 produzierten, die MMP-Aktivität ähnlich stark

wie Zellen, die nur eine IFN- γ -Defizienz aufwiesen (Abb.42A, B). Unabhängig von der Art des Zellkontaktes und der Stimulation wurde in den Überständen der Kokulturen von FLS mit arthritischen IL-17^{-/-}IFN- γ ^{-/-} Milzzellen eine erhöhte MMP-Gesamtaktivität sowie eine gesteigerte Aktivität von MMP-3 und MMP-9 als in vergleichbaren Kontrollüberständen festgestellt (Abb.42A, B).

A) MMP-Gesamtaktivität:



B) MMP-3 und -9 Aktivität:

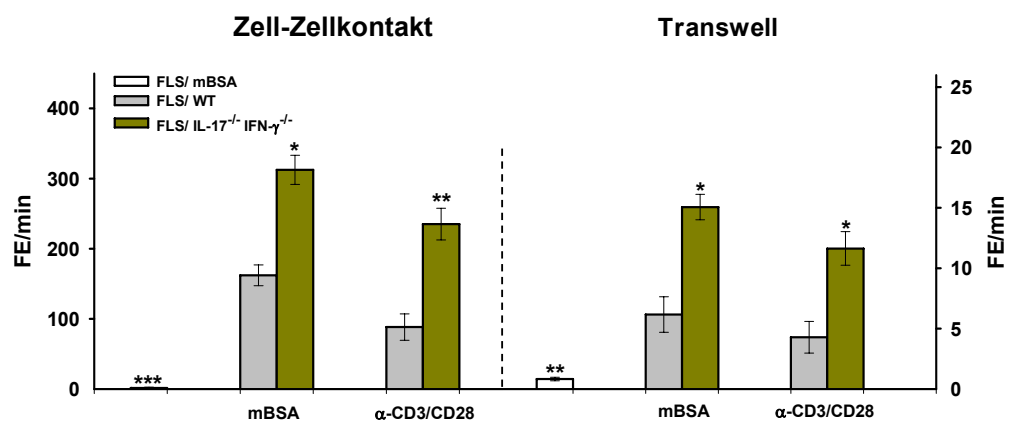


Abb.42 Bestimmung der MMP-Gesamtaktivität sowie der Aktivitäten von MMP-3 und MMP-9 in Kokultur-Überständen synovialer Fibroblasten und Milzzellen. Naive primäre FLS wurden für 36h im direkten Zell-Zellkontakt bzw. für 48h indirekt über Membraneinsätze mit mBSA- oder anti-CD3/CD28-stimulierten Milzzellen arthritischer WT- oder IL-17^{-/-}IFN- γ ^{-/-} Tiere in 12-Well-Platten kokultiviert. In den Kokulturüberständen wurde A) die MMP-Gesamtaktivität über den Umsatz von Peptid 1 sowie B) die Aktivität von MMP-3 und MMP-9 über den Umsatz von Peptid 2 mittels Fluorometer bestimmt. Als Negativkontrollen dienten die Überstände mBSA-stimulierter bzw. unstimulierter FLS. Bezugspunkt der dargestellten Signifikanzen sind die Überstände der Kokulturen von FLS mit AIA-WT-Milzzellen mit (*) $p \leq 0,1$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Gezeigt sind repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Experimenten.

4.7.2.2 Zymographischer Nachweis der MMP-9-Aktivität in Überständen synovialer Fibroblasten

Übereinstimmend mit den Ergebnissen des Aktivitätsassays stimulierten arthritische IL-17^{-/-}IFN- γ ^{-/-} Milzzellen die synovialen Fibroblasten verstärkt zur Freisetzung des Gelatineverdauenden Enzyms MMP-9 und dies sowohl beim direkten als auch beim indirekten Zellkontakt (Abb.43).

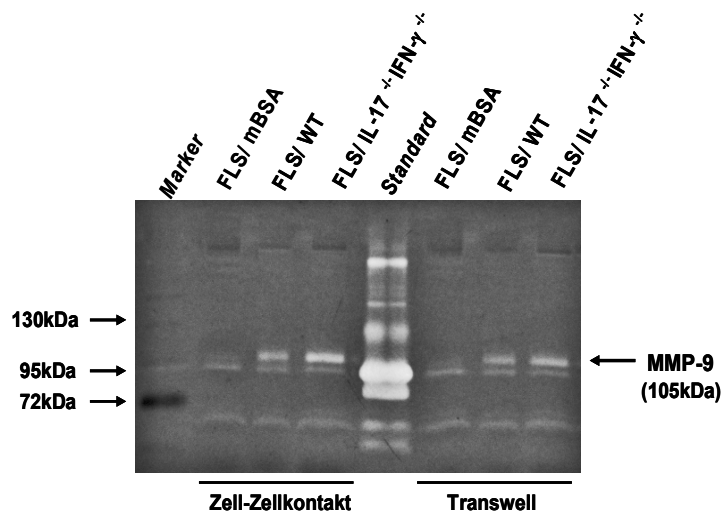


Abb.43 Gelatine-Zymographie von Kokultur-Überständen synovialer Fibroblasten und Milzzellen. Naive primäre FLS wurden für 36h im direkten Zell-Zell-Kontakt bzw. für 48h indirekt über Membraneinsätze mit mBSA-stimulierten Milzzellen arthritischer WT- oder IL-17^{-/-}IFN- γ ^{-/-} Tiere in 12-Well-Platten kokultiviert. Die MMP-9-Aktivität in den Kokultur-überständen wurde zymographisch mittels Gelatineverdau visualisiert. Als Marker wurde ein humaner MMP-9-Standard mitgeführt.

4.7.2.3 TIMP-und MMP-Expressions (Transkriptions) profile

Die über Real-Time-PCR ermittelte verstärkte Transkription von MMPs sowie die verringerte TIMP-Expression durch FLS, die mit arthritischen IL-17^{-/-}IFN- γ ^{-/-} Milzzellen kokultiviert wurden (Abb.44), untermauern die Resultate der vorange-gangenen Experimente. Vergleichsweise gering bzw. nahezu keine MMP-Expression und erhöhte TIMP-Spiegel wurden in mit Antigen stimulierten Fibroblasten detektiert (Abb.44). Die hierbei festgestellten Unterschiede der MMP/TIMP-Expressionsraten ergaben sich jeweils aus dem Vergleich mit AIA-WT-Zell-stimulierten Fibroblasten.

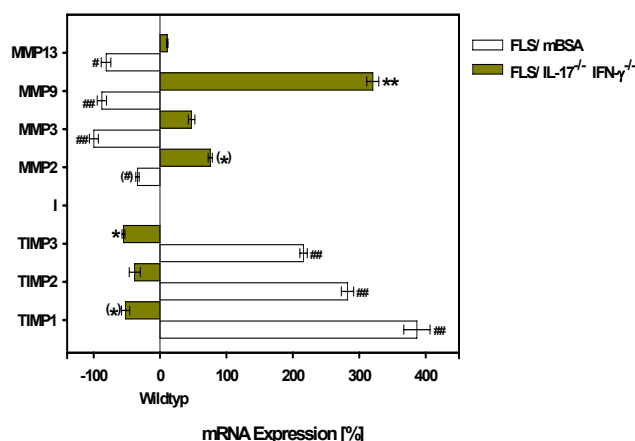


Abb.44 mRNA-Expression von MMPs, TIMPs und RANKL in aktivierten FLS. Naive primäre FLS wurden für 36h im direkten Zell-Zellkontakt mit mBSA-stimulierten Milzzellen arthritischer WT- oder IL-17^{-/-}IFN- γ ^{-/-} Tiere in 12-Well-Platten kokultiviert. Aus den abgetrennten Fibroblasten wurde die RNA isoliert, die mRNA unter Verwendung eines Poly(T)-Primers in cDNA umgeschrieben und diese mittels Real-Time-PCR analysiert. Bezugspunkt der dargestellten Signifikanzen sind FLS, die mit AIA-WT-Milzzellen kokultiviert wurden, mit (*), (#) $p \leq 0,1$; *,# $p \leq 0,05$; **,### $p \leq 0,01$. Gezeigt sind repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Experimenten.

4.7.2.4 Bestimmung ausgewählter Zytokine in Kokulturüberständen

Die Konzentration des Osteoklastogenese-fördernden RANK-Liganden und geringfügig auch die von IL-6 nahm in Kulturüberständen von Fibroblasten nach der Stimulation mit arthritischen IL-17^{-/-}IFN- γ ^{-/-} Milzzellen zu (Abb.45). OPG, das durch Bindung an RANKL dessen weitere Signalvermittlung blockiert, wurde durch Fibroblasten, die mit AIA-IL-17^{-/-}IFN- γ ^{-/-} Milzzellen kultiviert wurden, weniger sekretiert als durch die vergleichbaren Kontrollen (Abb.45).

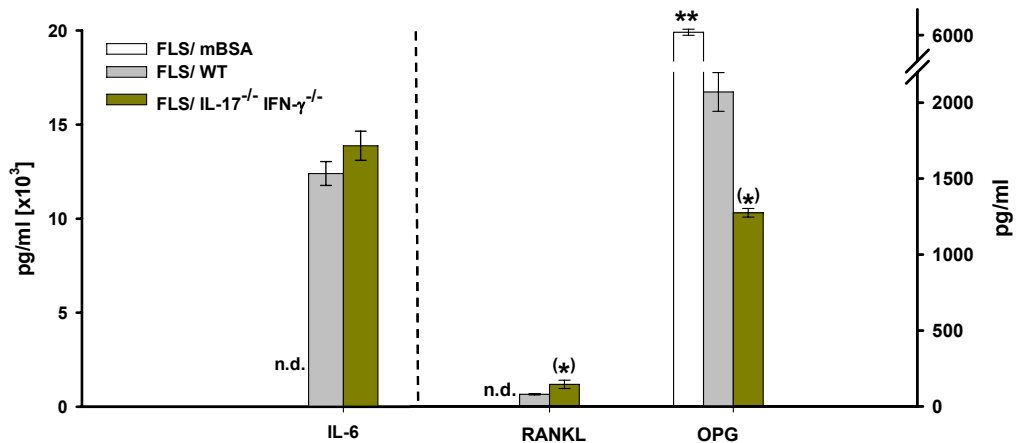


Abb.45 Zytokinbestimmung in Kokultur-Überständen. Naive primäre FLS wurden für 36h im direkten Zell-Zellkontakt mit mBSA-stimulierten Milzzellen arthritischer WT- oder IL-17^{-/-}IFN- γ ^{-/-} Tiere in 12-Well-Platten kokultiviert. Mittels ELISA wurde die Konzentration ausgewählter Zytokine, die im direkten Bezug zur Knochendestruktion stehen, bestimmt. Bezugspunkt der dargestellten Signifikanzen sind die Überstände der Kokulturen von FLS mit AIA-WT-Milzzellen mit * p≤0,05; ** p≤0,01; *** p≤0,001. Gezeigt sind repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassung

Milzzellen arthritischer IL-17-/IFN- γ -defizienter Tiere stimulierten ähnlich wie IFN- γ ^{-/-} Zellen das „arthritische Potenzial“ primärer Fibroblasten wesentlich stärker als vergleichbare WT-Zellen. Der zusätzliche Verlust des proinflammatorischen Zytokins IL-17 konnte demnach der durch den IFN- γ -Mangel hervorgerufenen Überproduktion Matrix-abbauender Proteasen und Knochendestruktions-vermittelnder Zytokine wie RANKL nicht entgegenwirken (Abb.42, 45).

5. Diskussion

Bei der RA handelt es sich um eine chronische entzündliche Erkrankung der Gelenke, die mit einem fortschreitenden Verlust artikulärer Knorpel- und Knochen-substanz einhergeht (Firestein et al., 2003). Hierbei führt eine initiale Entzündungsreaktion im Synovium, die hauptsächlich durch T-Zellen getragen wird, zur Aktivierung von Fibroblasten, die verstärkt Knorpel- und Knochen-abbauende Enzyme sezernieren und gleichzeitig zur Aufrechterhaltung des proinflammatorischen Milieus beitragen. Die genetische Assoziation der RA mit Mutationen in MHC-Klasse-II-Allelen legt einen durch CD4⁺ T-Zellen geprägten Krankheitsverlauf nahe (Feldmann et al., 1996; Fugger et al., 2000). Über die Regulation der Aktivität anderer Immunzellen und gewebsspezifischen Zellen kontrollieren CD4⁺ T-Zellen Art und Verlauf der Immunreaktion. Die dafür notwendigen Signale werden entweder über direkten Zell-Zell-Kontakt oder über auto- bzw. parakrine Sekretion von Signalmolekülen (Zytokine, Chemokine) vermittelt (Vey et al., 1996; McInnes et al., 1997). Das Verständnis der Wirkmechanismen CD4⁺ T-Zellen bzgl. Initiation und Progression der RA wurde durch die erstmals von Mosmann et al. (1986) charakterisierten Th1- und Th2-Subpopulationen entscheidend vorangetrieben. Die Entdeckung weiterer sowohl proinflammatorisch als auch regulatorisch wirkender Th-Subpopulationen und deren assoziierter Zytokine in den letzten Jahren führte zu einer Erweiterung und teilweise auch Korrektur des Th1/Th2-Paradigmas. Damit eröffneten sich neue interessante Erklärungsmodelle und potenzielle Therapieansätze für das komplexe Krankheitsgeschehen der RA.

Neben den verschiedenen CD4⁺ Th-Zellpopulationen sind B-Zellen, Antigen-präsentierende Zellen, Makrophagen sowie synoviale Fibroblasten wichtige zelluläre Effektoren der Entzündungs- und Destruktionsprozesse bei der RA. Eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Entzündung und Zerstörung der Gelenkstruktur spielen hierbei unter anderem Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α und IFN- γ , die zahlreiche matrixabbauende Proteasen (MMPs, Kathepsine) unterschiedlich stark induzieren und das Zellwachstum nachhaltig beeinflussen können (Otero und Goldring 2007).

Das im Rahmen dieser Promotionsarbeit verwendete Modell der AIA zeigt hinsichtlich der T-Zell-abhängigen Entzündungsreaktion und der daraus resultierenden Knorpel- und Knochendestruktion große Analogien zur RA. Im Mittelpunkt der experimentellen Untersuchungen standen hierbei die Veränderungen klinischer und immunologischer Parameter der AIA infolge der Modulation des Gleichgewichts der inflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-17 sowie der Depletion regulatorischer T-Zellen. Der zweite Schwerpunkt beschäftigte sich mit der pathogenen Wirkung von IFN- γ und IL-17 auf naive synoviale Fibroblasten und in diesem Zusammenhang

auch mit der veränderten Expression verschiedener Knochenmetabolismus regulierender Zytokine wie RANKL, OPG oder IL-6.

5.1 Th1- und Th17-Zellen bei der AIA

Dem typischen Th1-Zytokin IFN- γ wurde aufgrund der in verschiedenen Tiermodellen gesammelten Erkenntnisse traditionell eine proinflammatorische Wirkung zugeordnet. Die Defizienz bzw. Neutralisation von IFN- γ führte im Modell der PGIA zu einem deutlich milderem Arthritisverlauf (Doodes et al., 2008). Neben der CIA zeichnet sich auch die Progression anderer Modell-Autoimmunerkrankungen wie die der EAE durch eine stark proinflammatorische Th1-Antwort aus (Ferber et al., 1996; Manoury-Schwartz et al., 2007). Allerdings erlaubte und erlaubt die Identifizierung neuer T-Zellsubpopulationen sowie deren Differenzierungsmechanismen und die hierbei involvierten Zytokine eine immer detailliertere Interpretation experimenteller Daten, und so konnte dem IFN- γ neben seiner inflammatorischen Eigenschaft u.a. für das Modell der AIA auch eine protektive Rolle nachgewiesen werden (Irmeler et al., 2007). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen entwickelten Mäuse, die nicht in der Lage waren, IFN- γ zu exprimieren bzw. WT-Tiere, die vor Arthritisbeginn mit einem neutralisierenden anti-IFN- γ -AK behandelt wurden, eine deutlich stärker ausgeprägte AIA als die entsprechenden Kontrollen (Abb.10). Bei den durchgeführten *In-vivo*-Studien führte die enorme Zunahme des Kniegelenkdurchmessers infolge des IFN- γ -Mangels teilweise zu einer vollkommenen Einschränkung des Bewegungsspielraumes des arthritischen Gelenkes. Der klinische Verlauf korrelierte hierbei mit der massiven Einwanderung neutrophiler Granulozyten in den Kniegelenkspalt, die bei den IFN- γ -defizienten Tiergruppen in den Histologiepräparaten der akuten Phase festgestellt wurde.

In den Versuchsgruppen mit IFN- γ -Mangel wurden sowohl bei Milzzellen als auch bei Zellen aus den Lymphknoten eine starke Erhöhung der Th2- und Th17-Immunantwort detektiert (Abb.12). Neben einer hohen Dosis des proinflammatorischen IL-17 konnte ebenfalls eine verstärkte Sekretion des Osteoklastogenesefördernden RANK-Liganden sowie der Th2-Zytokine IL-4 und IL-5 nachgewiesen werden (Abb.12). Die erhöhte Produktion der Th2- und Th17-Zytokine könnte hierbei auf die mangelnde Regulation bzw. Hemmung durch IFN- γ zurückzuführen sein. In verschiedenen *In-vitro*-Studien wurde bereits eine konzentrationsabhängige Inhibition der Th2- und Th17-Antwort durch die Zugabe von rekombinantem IFN- γ gezeigt (Chu et al., 2007; Irmeler et al., 2007). Eine Dysregulation von Th-Zellpopulationen bestätigte sich zudem durch die Hochregulation der mRNA-Spiegel der Th17-Differenzierungs- und Stabilisierungsfaktoren Ror γ , IL-21 und IL-23 in Milzzellen IFN- γ -defizienter Tiere (Abb.14). Schon nach der 1. Immunisierung wurde

bei IFN- γ -Mangel eine verstärkte Th17-Antwort von aus Augenblut isolierten Lymphozyten mittels Real-Time-PCR gemessen (Abb.15). Die im weiteren Verlauf der Immunisierung und nach Arthritisinduktion rückläufige Th17-Antwort im Blut spricht für einen Migrationprozess der Th17-Effektorzellen in periphere lymphatische Organe sowie das entzündete Kniegelenk (Abb.15). Im SKG-Arthritismodell konnte für diese migrierenden Th17-Zellen ein spezifischer Phänotyp, der an die Expression des Chemokinrezeptores 6 (CCR6) gebunden ist, beschrieben werden. Durch Applikation eines blockierenden anti-CCR6-AK wurde ein verzögerter, milderer Arthritisverlauf erreicht, was das pathogenetische Potenzial dieser Th17-Zellen unterstreicht (Hirota et al., 2007). Zudem konnte im EAE-Modell gezeigt werden, dass die höchste Dichte IL-17-produzierender Zellen schon vor dem Maximum der Erkrankung in der Milz vorzufinden ist und im Verlauf der Krankheit ein großer Teil der IL-17-produzierenden Zellen im entzündeten Gewebe nachweisbar war (Korn et al. 2007). Ähnlich frühzeitige Migrationseffekte führen auch im Modell der AIA durch Mangel an IFN- γ zu einer raschen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und einer Verstärkung der Entzündung im arthritischen Gelenk.

Der vorzugsweise proinflammatorische „Th17-Phänotyp“ IFN- γ -defizienter Tiere wird zum großen Teil auch durch das bei der AIA angewandte Immunisierungsschema bedingt. Neben dem Antigen sind es vor allem die vor dem Auslösen der Arthritis verabreichten hitzeinaktivierten Mykobakterien des CFA, die für die Polarisierung der Immunantwort in diesem Modell verantwortlich sind. Mittlerweile ist bekannt, dass *Mycobacterium tuberculosis* nicht nur eine Th1- (Pohlers et. al., 2004), sondern verstärkt auch eine Th17-Antwort hervorrufen kann (Khader et al., 2007). So stellten beispielsweise Matthys et al. (1999) ein veränderten Krankheitsverlauf fest, wenn CIA-susceptible DBA/1-Mäuse mit CFA bzw. mit IFA und dem Antigen (Kollagen II (KII)) behandelt wurden. IFN- γ -R^{-/-} Mäuse, die mit KII und IFA immunisiert wurden, wiesen im Gegensatz zum Wildtyp (25% Arthritisinzidenz) keinerlei Arthritis-symptome auf. Im Vergleich zeigten 81% der KII/CFA-immunisierten IFN- γ -R^{-/-} Tiere eine erhöhte CIA-Suszeptibilität (WT: 63%). Die von Matthys et al. (1999) veröffentlichten Daten sprechen zum einen für eine dominante Rolle der mykobakteriellen CFA-Komponente beim Anschalten der inflammatorischen Immunantwort und einer daraus resultierenden Verstärkung der Pathogenese bei der CIA. Zum anderen zeigen sie aber auch, dass endogenes IFN- γ über Induktion seines Signalweges in der Lage ist, der CFA-vermittelten CIA-Progression protektiv entgegenzuwirken.

Diese Befunde bekräftigen das entzündungshemmende Potenzial von IFN- γ , welches natürlich in Abhängigkeit vom Modell und der damit verbundenen Kinetik der Krankheit betrachtet werden muss. Sie unterstreichen abermals die komplexe

Verzahnung einer anti- bzw. proinflammatorischen Immunantwort bei auftretendem IFN- γ -Mangel.

Wie von der gesteigerten Zytokinproduktion aus stimulierten Milz- und Lymphknotenzellen (Antigen bzw. polyklonal) IFN- γ -defizienter Mäuse zu erwarten war, besitzen diese im Vergleich zum WT eine höhere Zahl CD4⁺ Zellen (Abb.16A). Im Gegensatz dazu war die Expression des Regulatoren-Transkriptionsfaktors FoxP3 sowie die Anzahl CD4⁺ FoxP3⁺ Zellen in diesen Tieren deutlich reduziert (Abb.16B). Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen in Zusammenhang mit der festgestellten verstärkten T-Zell-Expansion IFN- γ -defizienter Tiere (Abb.13) lassen auf eine gestörte Treg-Zellpopulation schließen, die ein unkontrolliertes Differenzierungs- und Wachstumsverhalten anderer Th-Subpopulationen bei IFN- γ -Mangel zulässt. Bereits 2005 zeigten Kelchtermans und Mitarbeiter in der CIA, dass IFN- γ -R^{-/-} Mäuse im Vergleich zum WT niedrigere FoxP3-mRNA-Spiegel aufwiesen. Wang et al. (2006) entdeckten bei ihren *In-vitro*-Studien, dass IFN- γ neben der entscheidenden FoxP3-Expressionserhöhung in CD4⁺CD25⁺ Zellen auch die Entwicklung CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ Zellen aus CD4⁺CD25⁻ Zellen steuert. Derartig generierte Zellen erreichten mit Hilfe von IFN- γ ihre volle funktionelle Treg-Aktivität, was sich z.B. in einem deutlich milderen EAE-Verlauf nach entsprechendem Zelltransfer ausdrückte. Des Weiteren wurde kürzlich eine neue, vom Th1-spezifischen Transkriptionsfaktor T-bet abhängige Treg-Population beschrieben (Koch et al., 2009). Hierbei moduliert T-bet die Migration, Homeostase und Funktion dieser Treg-Zellen während der klassischen Th1-Antwort. Neben den bekannten Treg-Zell-Oberflächenmolekülen wie GITR und CTLA-4 exprimieren diese CD4⁺FoxP3⁺ Zellen ebenfalls den normalerweise auf Th1-Zellen durch T-bet induzierten Chemokin-Rezeptor 3 (CXCR3). Wie solche IFN- γ / T-bet-gesteuerten CXCR3⁺FoxP3⁺ Zellen die Th1-vermittelten lymphoproliferativen Symptome in FoxP3-defekten „Scurfy“-Mäusen kontrollieren und reduzieren, bedarf allerdings weiterer Aufklärung.

Die Funktion CD4⁺ T-Zellen als einer der Haupteffektoren von Entzündung und damit letztendlich Destruktion in der AIA bestätigte sich durch den milderen klinischen Verlauf sowie die verringerte Zytokinsekretion und T-Zellproliferation, die bei CD4-depletierten IFN- γ -^{-/-} Tieren festgestellt wurde (Abb.17, 19, 20). Wong et al. (2006) zeigten ebenfalls im AIA-Modell eine schwächer ausgeprägte Entzündung nach transgener Expression eines anti-CD4-AK. Ähnliche Beobachtungen konnten auch im Modell der CIA gemacht werden (Ehinger et al., 2001).

Die experimentellen Befunde, die in verschiedenen Modellen mit IFN- γ - bzw. IFN- γ -R-defizienten Tieren gesammelt werden konnten, widerlegen überzeugend, dass IFN- γ als ausschließlich proinflammatorisch wirkendes Zytokin einzuordnen ist und führten gleichzeitig zu einer differenzierteren Betrachtungsweise des von Mosmann et al. (1986) begründeten Th1/Th2-Paradigmas. Das anti-inflammatorische bzw.

immunmodulatorische Potenzial von IFN- γ konnte in verschiedenen Modellen von Autoimmunerkrankungen wie der Arthritis nachgewiesen werden (Ferber et al., 1996; Willenborg et al., 1999; Guedez et al., 2001; Irmeler et al., 2007). Auch die im Rahmen unserer AIA-Experimente festgestellte Störung der Th1-Antwort infolge der IFN- γ -Defizienz, die eine Verschiebung der Th-Zellbalance in Richtung „Th17/Th2“ bedingte, unterstreicht den immunregulatorischen Charakter von IFN- γ . Zu dem weist die deutlich stärkere T-Zell-Expansion sowie die geringere Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 *in vivo* und *in vitro* auf einen Verlust funktionsfähiger regulatorischer T-Zellen hin, der durch das Fehlen von IFN- γ erklärt werden könnte.

Das unter anderem bei IFN- γ -Mangel verstärkt produzierte Zytokin IL-17 und die dazugehörige Th17-Subpopulation stellten den Schwerpunkt der weiteren Untersuchungen dar. Studien mit IL-12p40^{-/-}, IL-23p19^{-/-} und IL-12p35^{-/-} Tieren in Modellen wie der EAE und CIA führten zur Erkenntnis, dass weniger die IL-12-abhängige Th1-Immunantwort proinflammatorische Effekte vermittelt, sondern dies vielmehr durch eine IL-23-beeinflusste Th-Zellpopulation geschieht (Cua et al., 2003; Murphy et al., 2003; Zhang et al., 2003). Das von dendritischen Zellen und Makrophagen in hohen Mengen produzierte Zytokin IL-23 sorgt vor allem für die Stabilisierung der Th17-Zellen, welche maßgeblich unkontrollierte Entzündungsreaktionen vorantreiben und damit letztendlich die Entstehung von Autoimmunerkrankungen unterstützen (Langrish et al., 2005). In einer Reihe aktueller Publikationen wurde gezeigt, dass das von Th17-Zellen sekretierte IL-17 (A und F) sowohl für die Pathogenese der RA als auch für die anderer organspezifischer Autoimmunerkrankungen und ihrer jeweiligen Modelle ein bedeutender proinflammatorischer Mediator ist (Chabaud et al., 1999; Lock et al., 2002; Fujino et al., 2003; Komiyama et al., 2006; Wilson et al., 2007).

Übereinstimmend mit dem beschriebenen stark proinflammatorischen Charakter von IL-17 verlief die AIA in IL-17^{-/-} Mäusen im Vergleich zum WT in abgeschwächter Form. Die Kniegelenkschwellung sowie die durch neutrophile Granulozyten in der akuten Phase verursachte Entzündung waren bei diesen Tieren signifikant reduziert (Abb.21). Ein ähnliches Phänomen beobachteten Koenders et al. (2005) ebenfalls bei wiederholter Antigengabe (Flare up) und Neutralisation von IL-17 vor Arthritis-induktion. In der Regel führen solche erneuten Antigeninjektionen zu einem exazerbierteren Verlauf als die Primärreaktion, jedoch zeigten gerade diese Mäuse nach Neutralisation ein milderer Krankheitsbild. Des Weiteren bedingte die Defizienz von IL-17 ein verzögertes Einsetzen, eine verringerte Schwere und vorzeitige Remission der EAE sowie eine verminderte Gelenkentzündung und in der Folge auch weniger destruktive Schädigungen bei der CIA (Nakae et al., 2003; Komiyama et al., 2006). Hingegen induzierte die adenovirale Überexpression von IL-17 eine

schwerere Progression der CIA (Lubberts et al., 2002). Die von Irmeler et al. (2007) in IFN- γ ^{-/-} Mäusen infolge einer erhöhten Th17-Antwort nachgewiesene Verschlimmerung der AIA unterstreicht ebenfalls die pathologische Relevanz von IL-17 in Autoimmunmodellen.

Mit Ausnahme von IL-5, das unter anderem Teil der Th2-Antwort ist, war die Mehrzahl der Zytokine in arthritische IL-17^{-/-} Mäuse geringer als in entsprechenden WT-Kontrollen (Abb.23). Trotz einer deutlich reduzierten Antigen-spezifischen (mBSA, PPD) T-Zell-Expansion bei IL-17-Defizienz wurde eine erhöhte Sekretion der Th2-Zytokine IL-4 und IL-5 gemessen (Abb.23). Diese Ergebnisse könnten auf eine verstärkt anti-inflammatorische Th2-getragene Immunantwort in IL-17^{-/-} Tieren hindeuten, was wiederum die geringere Entzündung und Destruktion im AIA-Verlauf erklären lässt. Das im Vergleich zum WT tendenziell schwächer sezernierte, aber dennoch in hoher Konzentration in den IL-17^{-/-} Mäusen vorzufindende Zytokin IFN- γ könnte neben seiner protektiven Funktion zudem eine wichtige Rolle für die Modulation der regulatorischen T-Zell-Population in diesen Mäusen einnehmen (Wang et al. 2006, Koch et al., 2009). Überraschenderweise wurde bei IL-17^{-/-} Mäusen im Vergleich zum WT kurz nach Arthritisinduktion eine leicht erhöhte Zahl CD4⁺ Zellen gemessen (Abb.24). Im Gegenzug nahm die T-Zell-Expansion nach *In-vitro*-Stimulation deutlich ab (Abb.22). Eine mögliche Erklärung dieses Ergebnisses bieten Treg-Zellen, welche die Differenzierung und das Wachstum der verschiedenen T-Zellsubpopulation in Autoimmunmodellen entscheidend modulieren. Während der Regulatoren-Transkriptionsfaktor FoxP3 von WT- und IL-17^{-/-} Tieren am Tag 1 nach Arthritisinduktion in gleichem Ausmaß exprimiert wurde (Abb.24B), transkribierten die Zellen IL-17-defizienter Mäuse nach TZR-Stimulation deutlich mehr FoxP3-mRNA (Abb.23B). Eine minimal erhöhte FoxP3-Expression zeigte sich auch auf Proteinebene (Abb.25). Die bei IL-17-Defizienz nachweislich höheren FoxP3-Mengen nach Restimulation könnten zu einer gesteigerten regulatorischen T-Zellaktivität führen und damit eine mögliche Ursache für die geringere T-Zell-Expansion und Zytokinsekretion in diesen Mäusen sein.

Es bleibt allerdings festzustellen, dass das pro-inflammatorische Zytokin IL-17 nicht der alleinige Mediator der AIA-Progression sein kann, sondern auch andere Zellpopulationen und deren assoziierte Zytokine in die Vermittlung der Krankheitsgeschehens involviert sind. Die schwach ausgeprägte, aber dennoch vorhandene Schwellung des arthritischen Kniegelenkes IL-17-defizienter Mäuse (Abb.21A) sowie das nahezu vollständige Ausbleiben der arthritischen Reaktion nach CD4-Depletion in IL-17^{-/-} Tieren (Abb.31A) untermauern diese These. Ähnlich der im AIA-Modell gemachten Beobachtung bedingte die Defizienz von IL-17 eine deutliche, allerdings ebenfalls nicht kompletten Remission der CIA (Nakae et al., 2003).

5.2 Regulatorische T-Zellen

Neben dem inflammatorischen Einfluss von Th1- und Th17-Zellen nehmen regulatorische T-Zellen eine zentrale Rolle bei der Kontrolle immunvermittelter Pathomechanismen der RA durch den Erhalt der Selbsttoleranz ein. So zeigte sich unter anderem, dass Treg-Zellen zwar in hoher Frequenz in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten auftreten, diese allerdings in ihrer suppressiven Wirkung soweit eingeschränkt sind, dass sie die anhaltende Inflammation in den betroffenen Gelenken nicht mehr unterbinden können (van Amelsfort et al., 2004; Liu et al., 2004; Mottonen et al., 2005). Valencia et al., (2006) fanden in diesem Zusammenhang heraus, dass das im RA-Synovium in hoher Konzentration vorliegende TNF- α über eine Verminderung bzw. Inhibierung der FoxP3-Expression die Aktivität der Regulatoren stark reduziert. Im Gegenzug hatte die Behandlung isolierter Zellen mit dem TNF- α -neutralisierenden AK Infliximab, die mit einer Erhöhung der FoxP3-Expression verbunden ist, die Wiederherstellung der regulatorischen Aktivität zur Folge (Nadkarni et al., 2007).

Um den im AIA-Modell bereits beschriebenen Stellenwert regulatorischer T-Zellen (Frey et al., 2005) vor allem im Kontext mit neuen Th-Zellsubpopulationen und den damit in Verbindung stehenden Zytokinen genauer zu charakterisieren, wurden Depletionsversuche sowohl in WT- als auch in IL-17- defizienten Tieren durchgeführt. Die Treg-Depletion infolge der anti-CD25-AK-Behandlung konnte hierbei durch die verringerte FoxP3-Expression kurz vor (Tag -6) bzw. kurz nach Arthritisinduktion (Tag 2) bestätigt werden (Abb.26C). Die dreimalige intraperitoneale Applikation des anti-CD25-AK vor bzw. während der Immunisierungen und vor Induktion der Arthritis führte im arthritischen Kniegelenk der WT-Mäuse wie zu erwarten zu einer Verschlimmerung der Entzündung und einer progressiveren Destruktion von Knorpel und Knochen (Abb.26A, B). Insbesondere die mRNA-Expression spezifischer Th17-Zytokine wie IL-17 und IL-22 war im Gegensatz zu den Kontrolltieren in den mit anti-CD25-Ak behandelten WT-Mäusen signifikant erhöht. Ein nach diesen Ergebnissen überraschender Krankheitsverlauf konnte bei Treg-depletierten IL-17-defizienten Mäusen beobachtet werden. Ähnlich wie beim WT kam es hier trotz des IL-17-Mangels zu einer Exazerbation der Erkrankung (Abb.29A). Obwohl sich die Entzündung und die Konzentration Matrix-spezifischer Autoantikörper im Serum gegenüber der Ratten-IgG-behandelten IL-17^{-/-} Kontrollgruppe deutlich erhöhte (Abb.29C.), war die Knorpel- und Knochendestruktion aufgrund des Fehlens des Osteoklastogenese-fördernden IL-17 (Kotake et al., 1999; Sato et al., 2006) auch bei den anti-CD25-behandelten IL-17^{-/-} Tieren erwartungsgemäß gering (Abb.29B).

Der durch die Behandlung mit anti-CD25-AK hervorgerufene Verlust von Treg-Zellen führte letztendlich zu einer stärkeren Expansion von Th-Zellen und damit zu einer unkontrollierten Produktion verschiedener inflammatorischer Zytokine (Abb.30A),

ohne dass die Differenzierung einer bestimmten Th-Subpopulation begünstigt wurde bzw. nur einem Zytokin eine dominierende Rolle zugeordnet werden konnte. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde auch in Untersuchungen mit anderen Modellen, teilweise unter Verwendung genetisch veränderter Tiere, die enorme Bedeutung von Regulatoren für den Erhalt des immunologischen Gleichgewichtes nachgewiesen. So neigen beispielsweise „Scurfy“-Mäuse zu massiven Autoimmunreaktionen, die letztendlich zu einem multiplen Organversagen führen (Godfrey et al. 1991). Ursache hierfür ist eine spontane Mutation im FoxP3 (Scurfin) - Gen, die das Fehlen regulatorischer T-Zellen zur Folge hat (Brunkow et al. 2001). Tiere, deren FoxP3-Gen gezielt manipuliert bzw. inaktiviert wurde, zeigen einen der „Scurfy“-Maus vergleichbaren Phänotyp (Fontenot et al. 2003; Khattri et al. 2003). Hingegen führte die Überexpression von FoxP3 in CTLA-4^{-/-} Tieren, deren Lebensspanne aufgrund unkontrollierter Expansion autoreaktiver T-Zellen nur drei bis vier Wochen beträgt, zu einer deutlichen Verringerung der Mortalitätsrate (Khattri et al. 2003). Im Modell der CIA wurde durch Treg-Depletion infolge wiederholter anti-CD25-Gabe vor Immunisierung mit Kollagen Typ II ein früherer Beginn sowie ein schwerer Verlauf der Erkrankung beobachtet (Morgan et al., 2003, 2005). Entscheidend für eine effektive anti-CD25-vermittelte Depletion der Regulatoren waren im CIA-Modell vor allem die Applikationszeitpunkte und die verabreichten Dosen des verwendeten Antikörpers. Interessanterweise konnte selbst eine höhere Menge des depletierenden AK, die allerdings erst nach Immunisierung bzw. kurz vor Beginn der Arthritis injiziert wurde, den Schweregrad der Erkrankung nicht mehr erhöhen (Loughry et al., 2005). Einer der Nachteile der anti-CD25-vermittelten Treg-Depletion, die unabhängig vom genetischen Hintergrund des jeweiligen Modellsystems einsetzbar ist, besteht in der Beeinflussung anderer aktivierter T- bzw. auch B-Zellen, die ebenfalls durch die Expression der α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) gekennzeichnet sind (Ortega et al., 1984). Um dies zu umgehen, generierte man Mäuse, die unter Kontrolle des foxp3-Lokus sowohl einen Diphtherie Toxin (DT)-Rezeptor als auch eGFP (enhanced green fluorescent protein) exprimieren (Lahl et al., 2007; Kim et al., 2007). Dies ermöglicht zum einen die gezielte DT-induzierte Depletion FoxP3⁺ Zellen und zum anderen über die Messung der GFP-Expression die Kontrolle der Effektivität der DT-Behandlung. Hierbei bleibt allerdings zu bedenken, dass auch der Transkriptionsfaktor FoxP3 als spezifischer muriner Regulatoren-Marker nicht unumstritten ist (Chen et al., 2008; Kim et al., 2007). Des Weiteren zeigen „FoxP3-depletierte“ Tiere einen sehr stark ausgeprägten „Scurfy“-ähnlichen Phänotyp, was zwar die Untersuchung schnell ablaufender Entzündungsprozesse ermöglicht (Lahl et al., 2007), allerdings deren Verwendung in komplexen Tiermodellen erschwert. Teilweise ungeklärt sind auch mögliche Nebenwirkungen der DT-Behandlung (Collier et al., 1971; Lee und Iglewski, 1984). Alternativ ließ sich auch mit dem Transfer

CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen die immunsuppressive Wirkung dieser Zellpopulation bestätigen. So konnten im CIA-Modell durch den Transfer prä-aktivierter CD25⁺ T-Zellen am Tag der Immunisierung die krankheitsverschlimmernden Effekte einer vorausgegangenen CD25-Depletion aufgehoben werden (Morgan et al., 2003). In der AIA führte der Transfer naiver bzw. prä-aktivierter CD25⁺ T-Zellen am Tag der Arthritisinduktion zu einer vergleichsweise geringeren Milderung des Krankheitsverlaufes (Frey et al., 2005). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Vielzahl der in den verschiedensten Modellen mit Treg-Zellen durchgeführten Depletions- und Transferexperimente in der Mehrzahl deren protektiven Charakter unterstreichen. Dabei bleibt allerdings zu berücksichtigen, dass oft nur die präventive Behandlung mit einer zum Teil unphysiologisch hohen Zahl an Regulatoren das Krankheitsbild verbessert und die erzielten therapeutischen Effekte vergleichsweise gering ausfallen. Des Weiteren veranlasst die bei unseren Experimenten festgestellte außergewöhnlich starke Ausprägung der AIA in CD25-depletierten IL-17^{-/-} Tieren zu einer differenzierteren Betrachtungsweise von IL-17 bzw. der IL-17-produzierenden Th-Subpopulation. In den letzten Jahren wurden außer bei der AIA auch bei Modellen wie CIA und EAE immer wieder verstärkt auf die Th17/IL-17-Zellpopulation als den zentralen Vermittler für Verlauf und Schwere der verschiedenen Erkrankungen verwiesen (Nakae et al., 2003, Koenders et al., 2005, Komiyama et al., 2006, Irmeler et al., 2007). Im AIA-Modell zeigte sich jetzt, dass IL-17 nicht der alleinige Mediator proinflammatorischer Reaktionen sein kann. Dabei bleibt allerdings offen, durch welche Mechanismen die Entzündung in Treg-depletierten IL-17^{-/-} Mäusen vorangetrieben und aufrechterhalten wird. Inwieweit die CD25-Depletion schon während der Immunisierungsphase eine Verschiebung der Th-Zellbalance bedingt und welche Rolle in diesem Kontext die Th17-assoziierten Zytokine IL-21 und IL-22 spielen, sind nur einige der Fragestellungen, die in diesem Zusammenhang noch zu klären sind.

5.3 Interaktionen von IL-17 und IFN- γ

Um weiteren Aufschluss über die funktionellen Eigenschaften von IL-17 im Modell der AIA zu erhalten, stand nachfolgend vor allem dessen Zusammenspiel mit IFN- γ im Fokus der Untersuchungen. Wie bereits diskutiert wurde, ist das immunmodulatorisch anzusehende Zytokin IFN- γ nachweislich ein Gegenregulator der R γ t-Expression und somit der IL-17-Produktion (Harrington et al., 2005, Cruz et al., 2006, Irmeler et al., 2007). Bisher ist allerdings nur sehr wenig über die wechselseitige Beeinflussung beider Zytokine *in vivo* bekannt.

In der CIA stellten Chu et al. (2007) sowohl in DBA/1-Mäusen als auch IFN- γ -defizienten C57BL/6-Tieren nach Immunisierung mit Kollagen Typ II eine erhöhte IL-17-Sekretion fest. Die Behandlung beider Mausstämmen mit einem polyklonalen anti-IL-17-AK kurz vor der Immunisierung bzw. täglich nach Arthritisbeginn führte zu einem deutlich milderen Krankheitsverlauf. Auch in der AIA reduzierte die Neutralisation von IL-17 die klinische Schwere der Erkrankung bei IFN- γ -Defizienz deutlich (Irmeler et al., 2007). Die in IFN- $\gamma^{-/-}$ Tieren durch *Borrelia burgdorferi*-Applikation induzierte Entwicklung einer destruktiven Osteoarthropathie wurde ebenfalls durch IL-17-Blockade verhindert (Burchill et al 2003).

Über die bisher aufgeführten experimentellen Ansätze hinausgehend, haben wir in unseren Untersuchungen IL-17 $^{-/-}$ Mäuse mit einem neutralisierenden anti-IFN- γ -AK behandelt bzw. den AIA-Verlauf in Tieren charakterisiert, die sowohl für IL-17 als auch für IFN- γ defizient waren. Überraschenderweise entwickelte sich bei den mit anti-IFN- γ behandelten IL-17-defizienten Mäusen sowie den IL-17 $^{-/-}$ IFN- $\gamma^{-/-}$ Tieren eine stärkere Arthritis als bei den mit Ratten-IgG behandelten IL-17 $^{-/-}$ Mäusen bzw. Wildtyp-Tieren (Abb.33A). Dabei war die durch Granulozyten, Makrophagen, B- und T-Zellen geförderte Entzündungsreaktion und damit die Schwellung des betroffenen Kniegelenkes so stark, dass diese nahezu mit den klinischen Werten der arthritischen IFN- $\gamma^{-/-}$ Maus korrelierten (Abb.10). Der schwerere Verlauf der AIA bei gleichzeitiger Defizienz von IL-17 und IFN- γ spiegelte sich zudem in der hohen Serum-Konzentration an Auto-Antikörpern gegen die im Gelenk freigesetzten Kollagene Typ I, II und Proteoglykane wider (Abb.33B). Anders als es die Literaturdaten vermuten ließen, konnte der Mangel bzw. das komplette Fehlen des pro-inflammatorischen Zytokins IL-17 die immunologischen Prozesse, die der Wegfall von IFN- γ induzierte, nicht inhibieren. Obwohl die beobachteten massiven Autoimmunreaktionen in IFN- γ -defizienten Mäusen vorrangig durch die Hochregulation von IL-17 verursacht wurden, weisen die mit den IL-17 $^{-/-}$ IFN- $\gamma^{-/-}$ Tieren gesammelten experimentellen Befunde auf ein komplexeres Zusammenspiel zwischen den beteiligten Zellen und Zytokinen hin. Möglicherweise bedingt die simultane Defizienz von IL-17 und IFN- γ in den entsprechenden Tieren ein funktionsübergreifenden Wechsel von Th-Zell-Subpopulationen und den von ihnen sekretierten Zytokinen.

Die erhöhte Expansion sowie die gesteigerte Zytokinproduktion *ex vivo* stimulierter Lymphknoten- und Milzzellen arthritischer IL-17 $^{-/-}$ IFN- $\gamma^{-/-}$ bzw. in anti-IFN- γ -behandelter IL-17 $^{-/-}$ Tiere (Abb.34, 35) könnte ebenfalls auf ein bereits diskutiertes verändertes Verhalten der Regulatoren-Population hindeuten. Ähnlich wie die IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäuse exprimierten auch die IL-17 $^{-/-}$ IFN- $\gamma^{-/-}$ Tiere weniger FoxP3 (Abb.36B). Interessanterweise war auch die Expression des Th1-Transkriptionsfaktors T-bet, die

bei IFN- γ -Defizienz noch schwach nachweisbar war, bei gleichzeitigem Fehlen von IL-17 und IFN- γ nicht mehr detektierbar (Abb.36B).

Thakker et al. (2007) generierten Tiere mit einer doppelten Defizienz für die IL-12-spezifische Untereinheit p35 sowie die IL23-spezifische Untereinheit p19. Diese Tiere sind zum einen nicht in der Lage, dass für die Th1-Entwicklung notwendige IL-12 zu produzieren, was letztendlich die IFN- γ -Synthese negativ beeinflusst. Zum anderen führt das Fehlen von IL-23 zu einer deutlich eingeschränkten Th17-Antwort. Aufgrund dieser Charakteristika bestehen, zumindest eingeschränkt, Gemeinsamkeiten mit den hier untersuchten IL-17^{-/-}IFN- γ ^{-/-} Tieren. Bei den durch Thakker et al. (2007) durchgeführten EAE-Studien zeigten IL12p35^{-/-}/ IL23p19^{-/-} Mäuse einen dem WT ähnlichen Krankheitsverlauf. Auch die Behandlung von WT-Tieren mit anti-IL-12- und anti-IL-23-AK ließ die EAE-Suszeptibilität und die Ausprägung inflammatorischer Infiltrate im ZNS unbeeinflusst.

Der festgestellte schwerere Verlauf der akuten Phase der Arthritis bei kompletter Abwesenheit von IFN- γ und IL-17 (Abb.33A) könnte dennoch durch IL-23 entscheidend moduliert werden. Bekanntermaßen vermittelt IL-23 nicht nur die Differenzierung bzw. Expansion des Th17-Phänotyps, sondern fördert auch unabhängig von IL-17 die Osteoklastogenese und treibt damit Destruktionsvorgänge entscheidend voran (Chen et al., 2008; Ju et al., 2008). Inwieweit IL-23 allein ohne IL-17 eine Entzündung etablieren und aufrechterhalten kann, ist derzeit noch Gegenstand der Forschung. Allerdings konnte bei IL-23-Defizienz eine Resistenz gegenüber Autoimmunerkrankungen wie der EAE und CIA nachgewiesen werden (Cua et al 2003; Murphy et al 2003).

Die Frage nach den immunologischen Mechanismen und pathologischen Prozessen, die den Verlauf der AIA bei der IL-17^{-/-}IFN- γ ^{-/-} Maus bestimmen, kann nach heutigem Wissenstand und den bisher gesammelten experimentellen Daten noch nicht vollständig beantwortet werden. Vorstellbar wäre, dass der Mangel an IFN- γ in Verbindung mit IL-23 ausreicht, das Gleichgewicht der Th-Zell-Subpopulationen derart zu verschieben, dass unabhängig von IL-17 andere Zytokine wie IL-21 oder IL-22 oder teilweise auch Th2-Zytokine konzentrations- und zeitabhängig proinflammatorische Effekte vermitteln. Noch nicht identifizierte Th-Zellpopulationen und deren Zytokine könnten an der Vermittlung von Entzündung und Destruktion in der AIA beteiligt sein bzw. auch ein fließender Übergang zwischen den verschiedenen Subpopulationen während des Krankheitsverlaufs wäre denkbar, so dass ein und dieselbe Th-Zelle sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Mediatoren sezerniert. Bei diesen Prozessen scheint IFN- γ , das u.a. auch die FoxP3-Expression in CD4⁺ T-bet⁺ T-Zellen induzieren kann (Koch et al., 2009), als einer der zentralen immunmodulatorischen Faktoren zu fungieren.

5.4 Einfluss von IFN- γ und IL-17 auf synoviale Fibroblasten

Die Th-Zell-Subpopulationen mit ihren zugehörigen Zytokinen regulieren ein breites Spektrum inflammatorischer Prozesse in der RA. Dabei kann es zu einem Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Aktivitäten kommen, wodurch chronische Entzündungen induziert und aufrechterhalten werden. Dies führt letztendlich zu schweren körperlichen Schädigungen, wie beispielsweise der nahezu vollständigen Zerstörung von Gelenken. Trotz enormer Fortschritte ist das Verständnis der Vernetzung und Organisation der verschiedenen Th-Subgruppen und deren Einfluss auf andere, für die Progression der RA verantwortliche Zelltypen oftmals noch nicht ausreichend, um der Destruktion von Knorpel und Knochen gezielt entgegenzuwirken.

Zur genaueren Charakterisierung der initialen Entzündungsreaktion und deren Einfluss auf die Aktivierung synovialer Fibroblasten wurden diese für die weiteren Untersuchungen mit Milzzellen von verschiedenen arthritischen Zytokin-defizienten Mausstämmen kokultiviert. Im Mittelpunkt des Interesses standen hierbei vor allem Osteoklastogenese-regulierende Parameter (RANKL, OPG) sowie die durch aktivierte Fibroblasten sezernierten MMPs und TIMPs, die den Metabolismus der extrazellulären Matrix kontrollieren. Die synovialen Deckzellen (Synoviozyten) bilden die Synovialis. Diese besteht aus zwei verschiedenen Zelltypen, den makrophagen-ähnlichen (Typ A) und den fibroblasten-ähnlichen (Typ B; FLS) Synoviozyten. Bei der RA transformieren speziell die FLS, die ursprünglich eine ein- bis zweischichtige Synovialmembran aufbauen, zu einer proliferierenden, invasiven Zellmasse, dem sogenannten Pannus. Dieser treibt die Zerstörung des umliegenden Gewebes entscheidend voran (Ritchlin et al., 2000). Die permanente Aufnahme und Abgabe inflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) durch Synoviozyten sowie deren Fähigkeit, sich direkt an die Knorpelmatrix anzuhängen, in diese einzudringen und dabei sukzessiv proteolytische Enzyme wie MMPs und Kathepsine auszuschütten, trägt essenziell zur Degradation der extrazellulären Matrix und letztendlich auch der Knochenerosion bei. Bisher sind >23 unterschiedliche MMPs charakterisiert worden, die auf Grund ihrer Substratspezifität und Struktur in sechs verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Die Mehrzahl dieser Proteasen besitzt die Fähigkeit, Matrixbestandteile wie z.B. Kollagene oder Fibronektin zu spalten. Die ebenfalls von Fibroblasten exprimierten MMP-Inhibitoren, die sogenannten TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases), regulieren neben weiteren Faktoren die Aktivität der MMPs. Unter physiologischen Bedingungen sorgt ein Gleichgewicht von MMPs und TIMPs für einen kontrollierten Metabolismus diverser Matrixkomponenten. Wird diese Balance allerdings durch eine erhöhte Konzentration proinflammatorischer Zytokine gestört, kann es zu zellulären Fehlregulationen und Gewebeschädigungen kommen.

Milzzellen IFN- γ -defizienter Tiere stimulierten die MMP-Expression durch FLS wesentlich stärker als vergleichbare WT-Milzzellen (Abb.40). Erwartungsgemäß konnte in den entsprechenden Kokulturüberständen auch eine erhöhte MMP-Aktivität detektiert werden (Abb.37, 38, 39). Hingegen wurden durch FLS nach Inkubation mit IFN- $\gamma^{-/-}$ Milzzellen weniger MMP-Inhibitoren (TIMPs) exprimiert (Abb.40). Diese Ergebnisse bieten eine Erklärungsmöglichkeit für die verstärkte Knorpel- und Knochendestruktion, die bei arthritischen IFN- $\gamma^{-/-}$ Tieren beobachtet wurde. Das Fehlen von IFN- γ in der Kokultur begünstigte, wie bei den vorangegangenen *In-vivo*-Studien bereits gezeigt, die T-Zellexpansion. Die daraus resultierenden Veränderungen der zellulären Interaktionen und des Zytokinmilieus bewirkten eine effektivere Synoviozytenaktivierung. Der fehlende inhibitorische Einfluss von IFN- γ , der vermutlich über die Stimulation der Expression des Regulatoren-Transkriptionsfaktors FoxP3 ausgeübt wird, führte vor allem zu einer Erhöhung der IL-17-Konzentration (Abb.12). IL-17 bzw. Th17-Zellen nehmen eine Schlüsselrolle bei chronisch-entzündlichen und rheumatischen Erkrankungen ein. So supprimiert IL-17 einerseits durch Inhibierung des Chondrozyten-Metabolismus den effizienten Aufbau der extrazellulären Matrix und induziert andererseits den Proteoglykanabbau bzw. die Unterbrechung der Proteoglykanbiosynthese, was schließlich zur Destruktion des Gelenkknorpels führen kann (Dudler et al., 2000; Lubberts et al., 2000). IL-17 stimulierte *in vitro* FLS, Chondrozyten und andere Zielzellen zur vermehrten Expression verschiedener MMPs sowie von GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α , die ihrerseits potente Entzündungsmediatoren darstellen und über positive Rückkopplungseffekte die Entstehung neuer Th17-Zellen initiieren (McInnes et al., 2007; Dardalhon et al., 2008). Sowohl IL-17 als auch die vorher genannten inflammatorischen Mediatoren bewirken eine verstärkte Granulopoiese sowie die Aktivierung und Attraktion von Neutrophilen im betroffenen Gelenk (Lubberts et al., 2000; Cai et al., 2001; Koshy et al., 2002). Die lokale Überexpression von IL-17 in CIA-Mäusen resultierte in einem erhöhten Influx und nachfolgend dem Anheften polymorphkerniger Zellen am Femur- und Patellaknorpel, was zu einer starken Schädigung bestehender Gelenkstrukturen führte (Lubberts et al. 2001). Obwohl in naiven Mäusen durch lokale IL-17-Überexpression ebenfalls ein verstärktes Vorkommen polymorphkerniger Zellen durch Lubberts et al. (2001) nachgewiesen wurde, kam es hier interessanterweise zu keinem feststellbaren Absterben von Chondrozyten bzw. zu krankhaften Knorpelveränderungen. Diese Ergebnisse unterstützten die Vermutung, dass der Unterschied zwischen dem „naiven“ und dem „arthritischen“ Zustand nicht allein dem proinflammatorischen IL-17 zuzuschreiben ist, sondern noch weitere immunpathologische Mediatoren in die Progression der Erkrankung involviert sein müssen.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden in den Kokulturen von FLS mit arthritischen IL-17^{-/-} Milzzellen reduzierte MMP-Aktivitäten gemessen (Abb.37, 38), hingegen war die TIMP-Expression dieser Fibroblasten erhöht (Abb.40). Diese Resultate bestätigen die bereits beschriebene proinflammatorische Effektorfunktion von IL-17.

In den Kulturüberständen von Synoviozyten, die mit IFN- γ -defizienten Milzzellen inkubiert wurden, konnte eine gesteigerte IL-6- und RANKL-Produktion und im Gegenzug eine verminderte Osteoprotegerin (OPG)-Sekretion als in den entsprechenden Kontrollen gemessen werden (Abb.41). Hingegen stimulierten IL-17-defiziente Milzzellen die Freisetzung von IL-6 und RANKL weit weniger als vergleichbar stimulierte WT-Zellen, förderten allerdings im verstärkten Maße die OPG-Expression (Abb.41). Die erhöhte Konzentration an IL-6 in den „IFN- γ -defizienten“ Kokultur-Ansätzen kommt im Wesentlichen durch die stärkere Aktivierung der Synoviozyten und Th17-Zellen zustande, die beide in der Lage sind, dieses Zytokin zu sezernieren. RANKL ist ein entscheidender Faktor der Osteoklastogenese, der von B-Zellen, Osteoblasten, Synoviozyten sowie aktivierten synovialen T-Zellen gebildet wird und entweder auf der Zelloberfläche oder in löslicher Form vorzufinden ist (Takayanagi et al., 2000). In der RA und in verschiedenen Arthritismodellen wird die RANKL-Expression im arthritischen Synovialgewebe durch Zytokine wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-17 hochreguliert (Kotake et al., 1999; Gravallesse et al., 2000; Sato et al., 2006). RANKL induziert die Differenzierung von Osteoklasten aus den entsprechenden Vorläuferzellen und sorgt über die Bindung an Osteoblasten bzw. seinem löslichen Rezeptor OPG für die Balance zwischen Knochenformation und -resorption. Der RANKL-Antagonist OPG, der von Osteoblasten, T-Lymphozyten und Knochenmarkstromazellen produziert wird, verhindert die Osteoklastogenese, indem er an RANKL bindet, was letztendlich die Signaltransduktion über RANK verhindert. So konnte beispielsweise durch die Behandlung mit OPG in der Adjuvanz-Arthritis zwar nicht die Entzündung, dafür aber die Knochendestruktion deutlich vermindert werden (Kong et al., 1999).

Bei den Kokulturen von FLS mit IFN- γ -defizienten Milzzellen führte vermutlich die mangelnde Regulation der Th17-Subpopulation und die damit verbundene erhöhte IL-17-Sekretion zu einer deutlich höheren RANKL-Expression. Das Fehlen von IFN- γ würde letztendlich aufgrund der hohen Konzentration an RANKL eine gesteigerte Osteoklastenaktivierung bedingen, was zu starken Schädigungen bestimmter Knochenstrukturen in den betroffenen Gelenken führt. Studien von Sato et al. (2006) zeigten einen klaren inhibitorischen bzw. protektiven Effekt von *in vitro*-generierten, IFN- γ -produzierenden Th1-Zellen auf RANKL/ M-CSF-stimulierte Knochenmarkszellen, die als Osteoklastenvorläuferzellen bzw. Osteoklasten definiert wurden. Im Gegensatz dazu konnten entsprechend stimulierte Monozyten/ Makrophagen des

Knochenmarks IFN- γ -Rezeptor-defizienter Mäuse (IFN- γ R1^{-/-}) aufgrund des blockierten, regulatorisch wirkenden IFN- γ -Signalweges zu Osteoklastenvorläufern differenziert werden (Huang et al., 1993). Die von Takayanagi et al. (2000) durchgeführten Untersuchungen mit Osteoklasten bzw. den aus Monozyten und Makrophagen generierten Vorläuferzellen zeigten ebenfalls, unabhängig von einer Th17-Blockade, einen spezifisch inhibitorischen Effekt von IFN- γ auf die Osteoklastenreifung. So fand man unter anderem bei diesen Studien heraus, dass der Prozess der Osteoklastogenese erhalten bleibt, wenn IFN- γ R-defiziente bzw. Stat1-defiziente Monozyten/Makrophagen-Vorläuferzellen mit aktivierten T-Zellen kokultiviert und mit RANKL stimuliert werden. Die Ursache für die Suppression der Osteoklastogenese ist mit dem Einfluss von IFN- γ auf den RANKL-RANK-Signalweg zu erklären. Takayanagi et al. (2000) zeigten, dass IFN- γ eine schnelle Degradation des RANK-Adaptorproteins TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) verursacht und somit die nachfolgend ablaufende RANKL-induzierte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und c-Jun verhindert. Im Vergleich führte eine Kokultivierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen mit *in vitro*-generierten Th17-Zellen zur einer effizienteren Differenzierung zu Osteoklasten (Sato et al., 2006). Hingegen verloren aus IL-17^{-/-} Mäusen generierte Th17-Zellen ihre Osteoklastogenesefördernde Wirkung. In IL-17^{-/-} bzw. IL-23^{-/-} Tieren wurde im Vergleich zum WT oder IFN- γ R1^{-/-} Tieren eine reduzierte Osteoklastenformation und als Folge eine Verringerung der LPS-induzierten Knochendestruktion festgestellt (Sato et al., 2006). Diese Ergebnisse unterstreichen, dass Th17-Zellen bzw. IL-17 nicht nur initiale Entzündungsprozesse vermitteln, die zum Entstehen einer Arthritis führen, sondern auch für die nachfolgenden destruktiven Schädigungen am Knochen vor allem über die synergistische Wirkung mit IL-23 verantwortlich sind. Zusammenfassend kann man sagen, dass der Wegfall von IFN- γ zu einer unkontrollierten IL-17-Produktion führt. Dies begünstigt die RANKL-vermittelte Osteoklastogenese *in vitro* und *in vivo* und ermöglicht schließlich die sukzessive Zerstörung von Gelenkknochen.

Die Auswirkungen, die das Fehlen von IFN- γ oder IL-17 auf die Aktivierung der FLS hatte, konnte weitgehend durch die enge wechselseitige Beziehung beider Zytokine erklärt werden. Interessant war es deshalb zu untersuchen, welche Effekte der simultane Wegfall beider Mediatoren zeigte, also die Kokultur von IL-17^{-/-}IFN- γ ^{-/-} Milzzellen mit FLS. Wie schon die Resultate der AIA in IL-17-/IFN- γ -defizienten Tieren vermuten ließen, aktivierten doppeldefiziente (IL-17^{-/-}IFN- γ ^{-/-}) Milzzellen die FLS stärker als entsprechende WT-Kontrollen, allerdings etwas weniger als nur die IFN- γ -defizienten Zellen (Abb.42, 43). Das Fehlen beider Zytokine stimulierte die Fibroblasten zur verstärkten Expression der untersuchten MMPs sowie von RANKL (Abb.44, 45). Hingegen transkribierten die FLS weniger TIMPs und die OPG-Freisetzung sank (Abb.44, 45). Betrachtet man diese Ergebnisse, so muss es

zweifelloos weitere wichtige Mediatoren oder Zellsubpopulationen in diesem komplexen Netzwerk geben, die den Mangel an IL-17 kompensieren bzw. das Zytokin vollständig ersetzen können. Bei der Kokultivierung wurde zwar ein TZR-stimuliertes Zellgemisch aus der Milz verwendet, dennoch könnten auch andere Zelltypen wie Makrophagen und DCs oder Zytokine wie beispielsweise IL-1 β , IL-23 und TNF- α eine entscheidende Rolle spielen (Cho et al., 2006). Erst kürzlich publizierte Daten beweisen, dass IL-23 unabhängig von IL-17 in der Lage ist, die Osteoklastogenese und damit die Knochendestruktion zu stimulieren. Ju et al. (2008) zeigten eine Expressionserhöhung von RANKL auf CD4⁺ Zellen nach Einzelstimulation mit IL-23 bzw. Kostimulation mit IL-23 und weiteren proinflammatorischen Zytokinen, die wiederum die Entwicklung von Osteoklastenvorläufern beeinflusste. Die Kombination von IL-23 mit IL-17, IL-1 β oder TNF- α hatte dabei additive Effekte auf die RANKL-Expression von CD4⁺ Zellen. Die stärkste Stimulation zeigte aber die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit IL-23, IL-1 β und TNF- α . Bei den FLS dagegen hatte IL-23 keinen Einfluss auf die RANKL-Bildung, stimulierten aber die Expression von RANK (Ju et al., 2008). Die IL-23-induzierte RANKL-Expression auf infiltrierenden T-Zellen sowie die IL-23-vermittelte Bildung von RANK durch FLS weist auf die enge wechselseitige Beeinflussung beider Zellpopulationen im Synovium hin. Auch ohne das Zusammenspiel mit Th-Zell-Zytokinen unterstützte IL-23 das Fortschreiten der Osteoklastogenese und sorgte für eine verstärkte Sekretion von Proteasen wie Kathepsinen und MMPs durch Knochenmarkszellen (Chen et al., 2008). Die Überexpression von IL-23 in IL-1Ra^{-/-} Mäusen führte zu einer beschleunigten Arthritisprogression sowie Anreicherung von RANKL um die Gelenkknöchel, was deren verstärkte Destruktion zur Folge hatte (Ju et al., 2008). IL-23 besitzt also nicht nur im Zusammenwirken mit CD4⁺ T-Zellen und ihren assoziierten Zytokinen, insbesondere IL-17, ein enormes arthritogenes Potenzial, sondern ist selbst ein elementarer Mediator pathologischer Destruktionsprozesse.

IL-17^{-/-}IFN- γ ^{-/-} Milzzellen aktivierten FLS weniger als nur IFN- γ -defiziente Zellen. Dieses Ergebnis könnte durch den zusätzlichen Mangel an IL-17 erklärt werden. Während IL-23 auf der einen Seite die Th17-Expansion unterstützt, begünstigt IL-17 auf der anderen Seite die Expression von IL-23 durch FLS (Kim et al., 2007). Im Gegensatz zur IFN- γ ^{-/-} Maus mit Th17-Dominanz könnte das Fehlen von IL-17 in den doppelt-defizienten Tieren diesen positiven Rückkopplungseffekt verhindern, was letztendlich die Aktivierung der FLS negativ beeinflussen würde.

Im Hinblick auf die stärkere FLS-Aktivierung durch sowohl INF- γ ^{-/-} als auch IL-17^{-/-} IFN- γ ^{-/-} Milzzellen sollten auch die zum Teil protektiv wirkenden Th2-Zellen (Joosten et al., 1999, Ruschpler et al., 2002) in diesen Mäusen nicht unberücksichtigt bleiben. Bei IFN- γ - und auch bei IL-17-/IFN- γ -defizienten Tieren wurde eine erhöhte Th2-Antwort nachgewiesen (Abb.12, 33A). Das Zytokin MIF (macrophage migration

inhibitory factor), welches unter anderem auch durch Th2-Zellen exprimiert wird (Bacher et al., 1996; Hamalainen et al., 2001), könnte hierbei als wichtiges Effektormolekül der FLS-Aktivierung fungieren. MIF ist mitverantwortlich für die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α und spielt eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Entzündungszellen im Synovium arthritischer Gelenke. Kokultorexperimente mit *in vitro* generierten Th2-Zellen bzw. MIF-defizienten Th-Zellen und arthritischen FLS zeigten eine MIF-abhängige Verstärkung der MMP-Expression und -Freisetzung durch FLS (Schurigt et al., 2008).

Die regulatorischen T-Zellen sind ebenfalls dazu in der Lage, den Knorpel- und Knochenmetabolismus direkt (Zell-Zellkontakt) als auch indirekt zu steuern. Zaiss et al., (2007) konnten *in vitro* erstmals zeigen, dass Treg-Zellen, über das Oberflächenmolekül CTLA-4, die Osteoklastenformation inhibieren können. Alternativ kann die Ausdifferenzierung der Osteoklasten indirekt über die RANKL/OPG-Balance und der Th17-Zellexpansion gesteuert werden (Bettelli 2006; Sato 2006; Weaver et al., 2006). Die bei unseren Kokultorexperimenten verringerte ROR γ -Expression, IL-17-Sekretion und Proliferation von *in vitro* generierten Th17-Zellen mit CD25⁺ Zellen (Abb.28) bestätigte die Möglichkeit der indirekten Einflussnahme der Regulatoren auf die Osteoklastendifferenzierung.

Die in dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass der zugewiesene proinflammatorische Charakter der Th1-Zellen bzw. von IFN- γ in dieser Form nicht weiter aufrechterhalten werden kann. Die Ergebnisse der Arbeit belegen, dass in der initialen Phase der AIA dem Zytokin IFN- γ eine mehr anti-inflammatorische und immunmodulatorische Funktion zugeschrieben werden kann. Dagegen spielen Th17-Zellen mit ihren dazugehörigen Zytokinen eine fundamentalere Rolle in der Pathogenese der AIA. Die nachweisbaren proinflammatorischen Eigenschaften von IL-17 und ihre Fähigkeit, die Osteoklastogenese, entscheidend zu beeinflussen, machen die Hemmung dieses Zytokins bzw. der Th17-Subpopulation zu einem weitaus vielversprechenderen therapeutischen Ansatzpunkt als für IFN- γ . Dennoch zeigen die in dieser Arbeit gesammelten Daten auch, dass IL-17 nicht ausschließlich und allein für die Inflammation und Gelenkdestruktion verantwortlich gemacht werden kann. Vermutlich spielen sowohl die restlichen Zytokine der Th17-Zellen als auch andere noch nicht vollständig charakterisierte Th-Subpopulationen und Zytokine im Entzündungsgeschehen der Arthritis eine entscheidende Rolle.

6. Literaturverzeichnis

Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. 2007. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*, **8**, 942-9.

Aggarwal S. and Austin L. Gurney 2003, IL-17: prototype member of an emerging cytokine family, *Journal of Leukocyte Biology*. **71**:1-8

Alamanos, Y., Voulgari, P. V. & Drosos, A. A. 2006. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum*, **36**, 182-8.

Albani, S., Keystone, E. C., Nelson, J. L., Ollier, W. E., La Cava, A., Montemayor, A. C., Weber, D. A., Montecucco, C., Martini, A. & Carson, D. A. 1995. Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis. *Nat Med*, **1**, 448-52.

Bacher, M., Metz, C. N., Calandra, T., Mayer, K., Chesney, J., Lohoff, M., Gerns, D., Donnelly, T. & Bucala, R. 1996. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7849-54.

Bayry, J., Siberil, S., Triebel, F., Tough, D. F. & Kaveri, S. V. 2007. Rescuing CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell functions in rheumatoid arthritis by cytokine-targeted monoclonal antibody therapy. *Drug Discov Today*, **12**, 548-52.

Becher, B., Durell, B. G. & Noelle, R. J. 2003. IL-23 produced by CNS-resident cells controls T cell encephalitogenicity during the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*, **112**, 1186-91.

Betelli, E., Dastrange, M. & Oukka, M. 2005. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 5138-43.

Betelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L. & Kuchroo, V. K. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, **441**, 235-8.

Bisikirska, B., Colgan, J., Luban, J., Bluestone, J. A. & Herold, K. C. 2005. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8⁺ T cell population and induces CD8⁺CD25⁺ Tregs. *J Clin Invest*, **115**, 2904-13.

Bluestone, J. A. & Abbas, A. K. 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, **3**, 253-7.

Bluestone, J. A. & Tang, Q. 2005. How do CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol*, **17**, 638-42.

Boissier, M. C., Assier, E., Biton, J., Denys, A., Falgarone, G. & Bessis, N. 2009. Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, **76**, 10-4.

- Brackertz, D., Mitchell, G. F. & Mackay, I. R. 1977. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum*, **20**, 841-50.
- Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paeper, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F. & Ramsdell, F. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*, **27**, 68-73.
- Brustle, A., Heink, S., Huber, M., Rosenplanter, C., Stadelmann, C., Yu, P., Arpaia, E., Mak, T. W., Kamradt, T. & Lohoff, M. 2007. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol*, **8**, 958-66.
- Buchner, E., Brauer, R., Schmidt, C., Emmrich, F. & Kinne, R. W. 1995. Induction of flare-up reactions in rat antigen-induced arthritis. *J Autoimmun*, **8**, 61-74.
- Burchill, M. A., Nardelli, D. T., England, D. M., DeCoster, D. J., Christopherson, J. A., Callister, S. M. & Schell, R. F. 2003. Inhibition of interleukin-17 prevents the development of arthritis in vaccinated mice challenged with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*, **71**, 3437-42.
- Burmester, G. R., Stuhlmüller, B., Keyszer, G. & Kinne, R. W. 1997. Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum*, **40**, 5-18.
- Cai, L., Yin, J. P., Starovasnik, M. A., Hogue, D. A., Hillan, K. J., Mort, J. S. & Filvaroff, E. H. 2001. Pathways by which interleukin 17 induces articular cartilage breakdown in vitro and in vivo. *Cytokine*, **16**, 10-21.
- Cederbom, L., Hall, H. & Ivars, F. 2000. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol*, **30**, 1538-43.
- Chabaud, M., Durand, J. M., Buchs, N., Fossiez, F., Page, G., Frappart, L. & Miossec, P. 1999. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*, **42**, 963-70.
- Charlton, B. & Lafferty, K. J. 1995. The Th1/Th2 balance in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, **7**, 793-8.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. & Wahl, S. M. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, **198**, 1875-86.
- Chen, G. Y., Chen, C., Wang, L., Chang, X., Zheng, P. & Liu, Y. 2008. Cutting edge: Broad expression of the FoxP3 locus in epithelial cells: a caution against early interpretation of fatal inflammatory diseases following in vivo depletion of FoxP3-expressing cells. *J Immunol*, **180**, 5163-6.

- Chen, L., Wei, X. Q., Evans, B., Jiang, W. & Aeschlimann, D. 2008. IL-23 promotes osteoclast formation by up-regulation of receptor activator of NF-kappaB (RANK) expression in myeloid precursor cells. *Eur J Immunol*, **38**, 2845-54.
- Cho, M. L., Kang, J. W., Moon, Y. M., Nam, H. J., Jhun, J. Y., Heo, S. B., Jin, H. T., Min, S. Y., Ju, J. H., Park, K. S., Cho, Y. G., Yoon, C. H., Park, S. H., Sung, Y. C. & Kim, H. Y. 2006. STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Immunol*, **176**, 5652-61.
- Chu, C. Q., Swart, D., Alcorn, D., Tocker, J. & Elkon, K. B. 2007. Interferon-gamma regulates susceptibility to collagen-induced arthritis through suppression of interleukin-17. *Arthritis Rheum*, **56**, 1145-51.
- Collier, R. J. & Kandel, J. 1971. Structure and activity of diphtheria toxin. I. Thiol-dependent dissociation of a fraction of toxin into enzymically active and inactive fragments. *J Biol Chem*, **246**, 1496-503.
- Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S. & Vignali, D. A. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, **450**, 566-9.
- Couper, K. N., Blount, D. G., de Souza, J. B., Suffia, I., Belkaid, Y. & Riley, E. M. 2007. Incomplete depletion and rapid regeneration of Foxp3+ regulatory T cells following anti-CD25 treatment in malaria-infected mice. *J Immunol*, **178**, 4136-46.
- Courtenay, J. S., Dallman, M. J., Dayan, A. D., Martin, A. & Mosedale, B. 1980. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature*, **283**, 666-8.
- Cromartie, W. J., Craddock, J. G., Schwab, J. H., Anderle, S. K. & Yang, C. H. 1977. Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cell walls. *J Exp Med*, **146**, 1585-602.
- Cruz, A., Khader, S. A., Torrado, E., Fraga, A., Pearl, J. E., Pedrosa, J., Cooper, A. M. & Castro, A. G. 2006. Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. *J Immunol*, **177**, 1416-20.
- Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S. A., Gorman, D., Kastelein, R. A. & Sedgwick, J. D. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, **421**, 744-8.
- Dalton, D. K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I. S., Bradley, A. & Stewart, T. A. 1993. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science*, **259**, 1739-42.
- Dalton, D. K., Haynes, L., Chu, C. Q., Swain, S. L. & Wittmer, S. 2000. Interferon gamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. *J Exp Med*, **192**, 117-22.

- Dardalhon, V., Korn, T., Kuchroo, V. K. & Anderson, A. C. 2008. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J Autoimmun*, **31**, 252-6.
- De Wall Malefyt, R., Wilson, N. J., Boniface, K., Chan, J. R., McKenzie, B. S., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., Lecron, J. C., Kastelein, R. A., Cua, D. J., McClanahan, T. K., Bowman, E. P., 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*, **8**, 950-7.
- Dolhain, R. J., van der Heiden, A. N., ter Haar, N. T., Breedveld, F. C. & Miltenburg, A. M. 1996. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, **39**, 1961-9.
- Doodles, P. D., Cao, Y., Hamel, K. M., Wang, Y., Farkas, B., Iwakura, Y. & Finnegan, A. 2008. Development of proteoglycan-induced arthritis is independent of IL-17. *J Immunol*, **181**, 329-37.
- Dudler, J., Renggli-Zulliger, N., Busso, N., Lotz, M. & So, A. 2000. Effect of interleukin 17 on proteoglycan degradation in murine knee joints. *Ann Rheum Dis*, **59**, 529-32.
- Dumonde, D. C. & Glynn, L. E. 1962. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Br J Exp Pathol*, **43**, 373-83.
- Ehinger, M., Vestberg, M., Johansson, A. C., Johannesson, M., Svensson, A. & Holmdahl, R. 2001. Influence of CD4 or CD8 deficiency on collagen-induced arthritis. *Immunology*, **103**, 291-300.
- Ehrenstein, M. R., Evans, J. G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D. A. & Mauri, C. 2004. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med*, **200**, 277-85.
- Fahlen, L., Read, S., Gorelik, L., Hurst, S. D., Coffman, R. L., Flavell, R. A. & Powrie, F. 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med*, **201**, 737-46.
- Feldmann, M., Brennan, F. M. & Maini, R. N. 1996. Rheumatoid arthritis. *Cell*, **85**, 307-10.
- Feng, G., Gao, W., Strom, T. B., Oukka, M., Francis, R. S., Wood, K. J. & Bushell, A. 2008. Exogenous IFN-gamma ex vivo shapes the alloreactive T-cell repertoire by inhibition of Th17 responses and generation of functional Foxp3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol*, **38**, 2512-27.
- Ferber, I. A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D. & Fathman, C. G. 1996. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol*, **156**, 5-7.

- Finkelman, F. D., Katona, I. M., Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. 1988. IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J Immunol*, **140**, 1022-7.
- Finnegan, A., Grusby, M. J., Kaplan, C. D., O'Neill, S. K., Eibel, H., Koreny, T., Czipri, M., Mikecz, K. & Zhang, J. 2002. IL-4 and IL-12 regulate proteoglycan-induced arthritis through Stat-dependent mechanisms. *J Immunol*, **169**, 3345-52.
- Firestein, G. S. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, **423**, 356-61.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, **4**, 330-6.
- Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol*, **6**, 1142-51.
- Frey, O., Petrow, P. K., Gajda, M., Siegmund, K., Huehn, J., Scheffold, A., Hamann, A., Radbruch, A. & Brauer, R. 2005. The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4+CD25+ T cells. *Arthritis Res Ther*, **7**, R291-301.
- Fritsch, R., Eselbock, D., Skriner, K., Jahn-Schmid, B., Scheinecker, C., Bohle, B., Tohidast-Akrad, M., Hayer, S., Neumuller, J., Pinol-Roma, S., Smolen, J. S. & Steiner, G. 2002. Characterization of autoreactive T cells to the autoantigens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 (RA33) and filaggrin in patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol*, **169**, 1068-76.
- Fugger, L. & Svejgaard, A. 2000. Association of MHC and rheumatoid arthritis. HLA-DR4 and rheumatoid arthritis: studies in mice and men. *Arthritis Res*, **2**, 208-11.
- Fujinami, R. S. & Oldstone, M. B. 1989. Molecular mimicry as a mechanism for virus-induced autoimmunity. *Immunol Res*, **8**, 3-15.
- Fujinami, R. S. & Oldstone, M. B. 1989. Molecular mimicry as a mechanism for virus-induced autoimmunity. *Immunol Res*, **8**, 3-15.
- Fujino, A., Ose, T., Yao, M., Tokiwano, T., Honma, M., Watanabe, N. & Tanaka, I. 2004. Structural and enzymatic properties of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *J Mol Biol*, **341**, 999-1013.
- Gabay, C. & McInnes, I. B. 2009. The biological and clinical importance of the 'new generation' cytokines in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*, **11**, 230.
- Gajewski, T. F. & Fitch, F. W. 1988. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol*, **140**, 4245-52.
- Gay, S., Gay, R. E. & Koopman, W. J. 1993. Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann Rheum Dis*, **52** Suppl 1, S39-47.

Gioud-Paquet, M., Auvinet, M., Raffin, T., Girard, P., Bouvier, M., Lejeune, E. & Monier, J. C. 1987. IgM rheumatoid factor (RF), IgA RF, IgE RF, and IgG RF detected by ELISA in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, **46**, 65-71.

Glant, T. T., Mikecz, K., Arzoumanian, A. & Poole, A. R. 1987. Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopathology. *Arthritis Rheum*, **30**, 201-12.

Godfrey, V. L., Wilkinson, J. E., Rinchik, E. M. & Russell, L. B. 1991. Fatal lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mouse requires T cells that mature in a sf thymic environment: potential model for thymic education. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5528-32.

Gravallese, E. M., Manning, C., Tsay, A., Naito, A., Pan, C., Amento, E. & Goldring, S. R. 2000. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum*, **43**, 250-8.

Gregersen, P. K., Silver, J. & Winchester, R. J. 1987. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, **30**, 1205-13.

Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Tollefsen, B. L., Kemper, C., Atkinson, J. P. & Ley, T. J. 2004. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*, **104**, 2840-8.

Guedez, Y. B., Latham, K., Rosloniec, F. E., 2001. Molecular mechanisms of the anti-inflammatory functions of interferons. *Immunobiology*, **212**, 9-10.

Hamalainen, H., Zhou, H., Chou, W., Hashizume, H., Heller, R. & Lahesmaa, R. 2001. Distinct gene expression profiles of human type 1 and type 2 T helper cells. *Genome Biol*, **2**, RESEARCH0022.

Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M. & Weaver, C. T. 2005. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, **6**, 1123-32.

Heit, A., Gebhardt, F., Lahl, K., Neuenhahn, M., Schmitz, F., Anderl, F., Wagner, H., Sparwasser, T., Busch, D. H. & Kastenmuller, K. 2008. Circumvention of regulatory CD4(+) T cell activity during cross-priming strongly enhances T cell-mediated immunity. *Eur J Immunol*, **38**, 1585-97.

Henzgen, S., Petrow, P. K., Thoss, K. & Brauer, R. 1996. Degradation of articular cartilage during the progression of antigen-induced arthritis in mice. A scanning and transmission electron microscopic study. *Exp Toxicol Pathol*, **48**, 255-63.

Herman, A., Kappler, J. W., Marrack, P. & Pullen, A. M. 1991. Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu Rev Immunol*, **9**, 745-72.

- Herman, A. E., Freeman, G. J., Mathis, D. & Benoist, C. 2004. CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J Exp Med*, **199**, 1479-89.
- Hibbert, L., Pflanz, S., De Waal Malefyt, R. & Kastelein, R. A. 2003. IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *J Interferon Cytokine Res*, **23**, 513-22.
- Hirota, K., Yoshitomi, H., Hashimoto, M., Maeda, S., Teradaira, S., Sugimoto, N., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ito, H., Nakamura, T., Sakaguchi, N. & Sakaguchi, S. 2007. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med*, **204**, 2803-12.
- Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, **299**, 1057-61.
- Huang, S. H., Frydas, S., Kempuraj, D., Barbacane, R. C., Grilli, A., Boucher, W., Letourneau, R., Madhappan, B., Papadopoulou, N., Verna, N., De Lutiis, M. A., Iezzi, T., Riccioni, G., Theoharides, T. C. & Conti, P. 2004. Interleukin-17 and the interleukin-17 family member network. *Allergy Asthma Proc*, **25**, 17-21.
- Huehn J., Feuerer M, Eulenburg K, Loddenkemper C, Hamann A, Jahr:(2006). Titel:Self-limitation of Th1-mediated inflammation by IFN-gamma. Zeitschrift:J Immunol: Nummer:176, Seite:2857-63.
- Hwang, E. S., Szabo, S. J., Schwartzberg, P. L. & Glimcher, L. H. 2005. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science*, **307**, 430-3.
- Hymowitz, S. G., Filvaroff, E. H., Yin, J. P., Lee, J., Cai, L., Risser, P., Maruoka, M., Mao, W., Foster, J., Kelley, R. F., Pan, G., Gurney, A. L., de Vos, A. M. & Starovasnik, M. A. 2001. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *Embo J*, **20**, 5332-41.
- Irmiler, I. M., Gajda, M. & Brauer, R. 2007. Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN-gamma-deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response. *J Immunol*, **179**, 6228-36.
- Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F. & Sakaguchi, S. 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol*, **162**, 5317-26.
- Ivanov, II, McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J. & Littman, D. R. 2006. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, **126**, 1121-33.
- Jahn, B., Burmester, G. R., Schmid, H., Weseloh, G., Rohwer, P. & Kalden, J. R. 1987. Changes in cell surface antigen expression on human articular chondrocytes induced by gamma-interferon. Induction of Ia antigens. *Arthritis Rheum*, **30**, 64-74.

Joosten, L. A., Lubberts, E., Helsen, M. M., Saxne, T., Coenen-de Roo, C. J., Heinegard, D. & van den Berg, W. B. 1999. Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Res*, **1**, 81-91.

Jordan, M. S., Boesteanu, A., Reed, A. J., Petrone, A. L., Holenbeck, A. E., Lerman, M. A., Najj, A. & Caton, A. J. 2001. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol*, **2**, 301-6.

Jovanovic, D. V., Di Battista, J. A., Martel-Pelletier, J., Jolicoeur, F. C., He, Y., Zhang, M., Mineau, F. & Pelletier, J. P. 1998. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol*, **160**, 3513-21.

Ju, J. H., Cho, M. L., Moon, Y. M., Oh, H. J., Park, J. S., Jhun, J. Y., Min, S. Y., Cho, Y. G., Park, K. S., Yoon, C. H., Min, J. K., Park, S. H., Sung, Y. C. & Kim, H. Y. 2008. IL-23 induces receptor activator of NF-kappaB ligand expression on CD4+ T cells and promotes osteoclastogenesis in an autoimmune arthritis model. *J Immunol*, **181**, 1507-18.

Kageyama, Y., Koide, Y., Yoshida, A., Uchijima, M., Arai, T., Miyamoto, S., Ozeki, T., Hiyoshi, M., Kushida, K. & Inoue, T. 1998. Reduced susceptibility to collagen-induced arthritis in mice deficient in IFN-gamma receptor. *J Immunol*, **161**, 1542-8.

Kamradt, T. 2007. [Th17 cells]. *Z Rheumatol*, **66**, 54-5.

Kelchtermans, H., De Klerck, B., Mitera, T., Van Balen, M., Bullens, D., Billiau, A., Leclercq, G. & Matthys, P. 2005. Defective CD4+CD25+ regulatory T cell functioning in collagen-induced arthritis: an important factor in pathogenesis, counter-regulated by endogenous IFN-gamma. *Arthritis Res Ther*, **7**, R402-15.

Kelchtermans, H., Billiau, A. & Matthys, P. 2008. How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check. *Trends Immunol*, **29**, 479-86.

Kelly, P. M., Bliss, E., Morton, J. A., Burns, J. & McGee, J. O. 1988. Monoclonal antibody EBM/11: high cellular specificity for human macrophages. *J Clin Pathol*, **41**, 510-5.

Khader, S. A., Bell, G. K., Pearl, J. E., Fountain, J. J., Rangel-Moreno, J., Cilley, G. E., Shen, F., Eaton, S. M., Gaffen, S. L., Swain, S. L., Locksley, R. M., Haynes, L., Randall, T. D. & Cooper, A. M. 2007. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol*, **8**, 369-77.

Khatti, R., Cox, T., Yasayko, S. A. & Ramsdell, F. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol*, **4**, 337-42.

Kim, J. M., Rasmussen, J. P. & Rudensky, A. Y. 2007. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol*, **8**, 191-7.

- Klareskog, L., Stolt, P., Lundberg, K., Kallberg, H., Bengtsson, C., Grunewald, J., Ronnelid, J., Harris, H. E., Ulfgren, A. K., Rantapaa-Dahlqvist, S., Eklund, A., Padyukov, L. & Alfredsson, L. 2006. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum*, **54**, 38-46.
- Kleinau, S., Erlandsson, H., Holmdahl, R. & Klareskog, L. 1991. Adjuvant oils induce arthritis in the DA rat. I. Characterization of the disease and evidence for an immunological involvement. *J Autoimmun*, **4**, 871-80.
- Knoechel, B., Lohr, J., Kahn, E., Bluestone, J. A. & Abbas, A. K. 2005. Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. *J Exp Med*, **202**, 1375-86.
- Koch, M. A., Tucker-Heard, G., Perdue, N. R., Killebrew, J. R., Urdahl, K. B. & Campbell, D. J. 2009. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol*, **10**, 595-602.
- Koenders, M. I., Lubberts, E., Oppers-Walgreen, B., van den Bersselaar, L., Helsen, M. M., Di Padova, F. E., Boots, A. M., Gram, H., Joosten, L. A. & van den Berg, W. B. 2005. Blocking of interleukin-17 during reactivation of experimental arthritis prevents joint inflammation and bone erosion by decreasing RANKL and interleukin-1. *Am J Pathol*, **167**, 141-9.
- Kolls, J. K. & Linden, A. 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*, **21**, 467-76.
- Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K. & Iwakura, Y. 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, **177**, 566-73.
- Kong, Y. Y., Feige, U., Sarosi, I., Bolon, B., Tafuri, A., Morony, S., Capparelli, C., Li, J., Elliott, R., McCabe, S., Wong, T., Campagnuolo, G., Moran, E., Bogoch, E. R., Van, G., Nguyen, L. T., Ohashi, P. S., Lacey, D. L., Fish, E., Boyle, W. J. & Penninger, J. M. 1999. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, **402**, 304-9.
- Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V. & Bettelli, E. 2007. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol*, **19**, 362-71.
- Koshy, P. J., Henderson, N., Logan, C., Life, P. F., Cawston, T. E. & Rowan, A. D. 2002. Interleukin 17 induces cartilage collagen breakdown: novel synergistic effects in combination with proinflammatory cytokines. *Ann Rheum Dis*, **61**, 704-13.
- Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S., Inoue, K., Kamatani, N., Gillespie, M. T., Martin, T. J. & Suda, T. 1999. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest*, **103**, 1345-52.
- Kramer, J. M. & Gaffen, S. L. 2007. Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *J Periodontol*, **78**, 1083-93.

- Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M. C. & von Boehmer, H. 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*, **6**, 1219-27.
- Lafyatis, R., Remmers, E. F., Roberts, A. B., Yocum, D. E., Sporn, M. B. & Wilder, R. L. 1989. Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids. *J Clin Invest*, **83**, 1267-76.
- Lahl, K., Loddenkemper, C., Drouin, C., Freyer, J., Arnason, J., Eberl, G., Hamann, A., Wagner, H., Huehn, J. & Sparwasser, T. 2007. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med*, **204**, 57-63.
- Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A. & Cua, D. J. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, **201**, 233-40.
- Laurence, A., Tato, C. M., Davidson, T. S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R. B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., Shevach, E. M. & O'Shea J, J. 2007. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*, **26**, 371-81.
- Lee, D. M. & Weinblatt, M. E. 2001. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, **358**, 903-11.
- Lee, H. & Iglewski, W. J. 1984. Cellular ADP-ribosyltransferase with the same mechanism of action as diphtheria toxin and Pseudomonas toxin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 2703-7.
- Lens, J. W., van den Berg, W. B., van de Putte, L. B. & Zwarts, W. A. 1986. Flare of antigen-induced arthritis in mice after intravenous challenge. Kinetics of antigen in the circulation and localization of antigen in the arthritic and noninflamed joint. *Arthritis Rheum*, **29**, 665-74.
- Lipsky P.; Rheumatoide Arthritis. In: Harrisons Innere Medizin 2, wissenschafts-Verlag Berlin (1999), S. 1921-29
- Liu, M. F., Wang, C. R., Fung, L. L. & Wu, C. R. 2004. Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol*, **59**, 198-202.
- Liu, Y. & Janeway, C. A., Jr. 1990. Interferon gamma plays a critical role in induced cell death of effector T cell: a possible third mechanism of self-tolerance. *J Exp Med*, **172**, 1735-9.
- Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., Langer-Gould, A., Strober, S., Cannella, B., Allard, J., Klonowski, P., Austin, A., Lad, N., Kaminski, N., Galli, S. J., Oksenberg, J. R., Raine, C. S., Heller, R. & Steinman, L. 2002. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*, **8**, 500-8.

- Loughry, A., Fairchild, S., Athanasou, N., Edwards, J. & Hall, F. C. 2005. Inflammatory arthritis and dermatitis in thymectomized, CD25+ cell-depleted adult mice. *Rheumatology (Oxford)*, **44**, 299-308.
- Lubberts, E., Joosten, L. A., van de Loo, F. A., van den Gersselaar, L. A. & van den Berg, W. B. 2000. Reduction of interleukin-17-induced inhibition of chondrocyte proteoglycan synthesis in intact murine articular cartilage by interleukin-4. *Arthritis Rheum*, **43**, 1300-6.
- Lubberts, E., Joosten, L. A., Oppers, B., van den Bersselaar, L., Coenen-de Roo, C. J., Kolls, J. K., Schwarzenberger, P., van de Loo, F. A. & van den Berg, W. B. 2001. IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis. *J Immunol*, **167**, 1004-13.
- Lubberts, E., Joosten, L. A., van de Loo, F. A., Schwarzenberger, P., Kolls, J. & van den Berg, W. B. 2002. Overexpression of IL-17 in the knee joint of collagen type II immunized mice promotes collagen arthritis and aggravates joint destruction. *Inflamm Res*, **51**, 102-4.
- Lubberts, E., Koenders, M. I. & van den Berg, W. B. 2005. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther*, **7**, 29-37.
- Manoury-Schwartz, B., Chiocchia, G., Bessis, N., Abehsira-Amar, O., Batteux, F., Muller, S., Huang, S., Boissier, M. C. & Fournier, C. 1997. High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. *J Immunol*, **158**, 5501-6.
- Marie, J. C., Letterio, J. J., Gavin, M. & Rudensky, A. Y. 2005. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med*, **201**, 1061-7.
- Matthys, P., Vermeire, K., Mitera, T., Heremans, H., Huang, S., Schols, D., De Wolf-Peeters, C. & Billiau, A. 1999. Enhanced autoimmune arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice is conditioned by mycobacteria in Freund's adjuvant and by increased expansion of Mac-1+ myeloid cells. *J Immunol*, **163**, 3503-10.
- McHugh, R. S., Whitters, M. J., Piccirillo, C. A., Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M. & Byrne, M. C. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*, **16**, 311-23.
- McInnes, I. B., Leung, B. P., Sturrock, R. D., Field, M. & Liew, F. Y. 1997. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat Med*, **3**, 189-95.
- McInnes, I. B. & Liew, F. Y. 2005. Cytokine networks--towards new therapies for rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*, **1**, 31-9.
- McInnes, I. B. & Schett, G. 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*, **7**, 429-42.

McNeill, A., Spittle, E. & Backstrom, B. T. 2007. Partial depletion of CD69low-expressing natural regulatory T cells with the anti-CD25 monoclonal antibody PC61. *Scand J Immunol*, **65**, 63-9.

Morgan, M. E., Suttmuller, R. P., Witteveen, H. J., van Duivenvoorde, L. M., Zanelli, E., Melief, C. J., Snijders, A., Offringa, R., de Vries, R. R. & Toes, R. E. 2003. CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, **48**, 1452-60.

Morgan, M. E., Flierman, R., van Duivenvoorde, L. M., Witteveen, H. J., van Ewijk, W., van Laar, J. M., de Vries, R. R. & Toes, R. E. 2005. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. *Arthritis Rheum*, **52**, 2212-21.

Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, **136**, 2348-57.

Mottonen, M., Heikkinen, J., Mustonen, L., Isomaki, P., Luukkainen, R. & Lassila, O. 2005. CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*, **140**, 360-7.

Murphy, C. A., Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W., McClanahan, T., Kastelein, R. A., Sedgwick, J. D. & Cua, D. J. 2003. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med*, **198**, 1951-7.

Nadkarni, S., Mauri, C. & Ehrenstein, M. R. 2007. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *J Exp Med*, **204**, 33-9.

Nakae, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Sudo, K., Iwase, M., Homma, I., Sekikawa, K., Asano, M. & Iwakura, Y. 2002. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity*, **17**, 375-87.

Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K. & Iwakura, Y. 2003. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol*, **171**, 6173-7.

Nathan, C. F., Murray, H. W., Wiebe, M. E. & Rubin, B. Y. 1983. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med*, **158**, 670-89.

Newton, J. L., Harney, S. M., Wordsworth, B. P. & Brown, M. A. 2004. A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis. *Genes Immun*, **5**, 151-7.

Niedbala, W., Wei, X. Q., Cai, B., Hueber, A. J., Leung, B. P., McInnes, I. B. & Liew, F. Y. 2007. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced

arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol*, **37**, 3021-9.

O'Dell, J. R., Nepom, B. S., Haire, C., Gersuk, V. H., Gaur, L., Moore, G. F., Drymalski, W., Palmer, W., Eckhoff, P. J., Klassen, L. W., Wees, S., Thiele, G. & Nepom, G. T. 1998. HLA-DRB1 typing in rheumatoid arthritis: predicting response to specific treatments. *Ann Rheum Dis*, **57**, 209-13.

Ortega, G., Robb, R. J., Shevach, E. M. & Malek, T. R. 1984. The murine IL 2 receptor. I. Monoclonal antibodies that define distinct functional epitopes on activated T cells and react with activated B cells. *J Immunol*, **133**, 1970-5.

Osorio, F., LeibundGut-Landmann, S., Lochner, M., Lahl, K., Sparwasser, T., Eberl, G. & Reis e Sousa, C. 2008. DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers. *Eur J Immunol*, **38**, 3274-81.

Otero, M. & Goldring, M. B. 2007. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, **9**, 220.

Panayi, G. S., Wooley, P. H., Griffin, J., Batchelor, J. R., Welsh, K. & Gibson, T. J. 1980. HLA antigens in rheumatoid arthritis. *Agents Actions Suppl*, **7**, 66-8.

Pearson, C. M. 1956. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med*, **91**, 95-101.

Petrow, P. K., Thoss, K., Katenkamp, D. & Brauer, R. 1996. Adoptive transfer of susceptibility to antigen-induced arthritis into severe combined immunodeficient (SCID) mice: role of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Invest*, **25**, 341-53.

Pflanz, S., Timans, J. C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J., Hibbert, L., Churakova, T., Travis, M., Vaisberg, E., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Wagner, J. L., To, W., Zurawski, S., McClanahan, T. K., Gorman, D. M., Bazan, J. F., de Waal Malefyt, R., Rennick, D. & Kastelein, R. A. 2002. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity*, **16**, 779-90.

Pohlers, D., Nissler, K., Frey, O., Simon, J., Petrow, P. K., Kinne, R. W. & Brauer, R. 2004. Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: influence on T helper cell activation. *Clin Exp Immunol*, **135**, 409-15.

Potter, M. & Wax, J. S. 1981. Genetics of susceptibility to pristane-induced plasmacytomas in BALB/cAn: reduced susceptibility in BALB/cJ with a brief description of pristane-induced arthritis. *J Immunol*, **127**, 1591-5.

Refaeli, Y., Van Parijs, L., Alexander, S. I. & Abbas, A. K. 2002. Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J Exp Med*, **196**, 999-1005.

Ritchlin, C. 2000. Fibroblast biology. Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Res*, **2**, 356-60.

- Robinson, D., Shibuya, K., Mui, A., Zonin, F., Murphy, E., Sana, T., Hartley, S. B., Menon, S., Kastelein, R., Bazan, F. & O'Garra, A. 1997. IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity*, **7**, 571-81.
- Rubtsov, Y. P. & Rudensky, A. Y. 2007. TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nat Rev Immunol*, **7**, 443-53.
- Ruschpler, P. & Stiehl, P. 2002. Shift in Th1 (IL-2 and IFN-gamma) and Th2 (IL-10 and IL-4) cytokine mRNA balance within two new histological main-types of rheumatoid-arthritis (RA). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **48**, 285-93.
- Saal, J. G., Kimmel, M., Steidle, M., Gerneth, F., Wagner, S., Fritz, P., Koch, S., Zacher, J., Sell, S., Einsele, H. & Muller, C. A. 1999. Synovial Epstein-Barr virus infection increases the risk of rheumatoid arthritis in individuals with the shared HLA-DR4 epitope. *Arthritis Rheum*, **42**, 1485-96.
- Sallusto, F., Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A. 2007. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*, **8**, 942-9.
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., Cua, D. J. & Takayanagi, H. 2006. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med*, **203**, 2673-82.
- Schindler, H., Lutz, M. B., Rollinghoff, M. & Bogdan, C. 2001. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *J Immunol*, **166**, 3075-82.
- Schneeberger, E. E., DeFerrari, M., Skoskiewicz, M. J., Russell, P. S. & Colvin, R. B. 1986. Induction of MHC-determined antigens in the lung by interferon-gamma. *Lab Invest*, **55**, 138-44.
- Schubert, D., Maier, B., Morawietz, L., Krenn, V. & Kamradt, T. 2004. Immunization with glucose-6-phosphate isomerase induces T cell-dependent peripheral polyarthritis in genetically unaltered mice. *J Immunol*, **172**, 4503-9.
- Schurigt, U., Pfirschke, C., Irmeler, I. M., Huckel, M., Gajda, M., Janik, T., Baumgrass, R., Bernhagen, J. & Brauer, R. 2008. Interactions of T helper cells with fibroblast-like synoviocytes: up-regulation of matrix metalloproteinases by macrophage migration inhibitory factor from both Th1 and Th2 cells. *Arthritis Rheum*, **58**, 3030-40.
- Sher, A. & Coffman, R. L. 1992. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu Rev Immunol*, **10**, 385-409.
- Shevach, E. M. 2006. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*, **25**, 195-201.

- Shevach, E. M., DiPaolo, R. A., Andersson, J., Zhao, D. M., Stephens, G. L. & Thornton, A. M. 2006. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunol Rev*, **212**, 60-73.
- Silman, A. J., MacGregor, A. J., Thomson, W., Holligan, S., Carthy, D., Farhan, A. & Ollier, W. E. 1993. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol*, **32**, 903-7.
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G. & Glimcher, L. H. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, **100**, 655-69.
- Takayanagi, H., Ogasawara, K., Hida, S., Chiba, T., Murata, S., Sato, K., Takaoka, A., Yokochi, T., Oda, H., Tanaka, K., Nakamura, K. & Taniguchi, T. 2000. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature*, **408**, 600-5.
- Thakker, P., Leach, M. W., Kuang, W., Benoit, S. E., Leonard, J. P. & Marusic, S. 2007. IL-23 is critical in the induction but not in the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, **178**, 2589-98.
- Tran, E. H., Prince, E. N. & Owens, T. 2000. IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J Immunol*, **164**, 2759-68.
- Trentham, D. E., Townes, A. S. & Kang, A. H. 1977. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med*, **146**, 857-68.
- Trinchieri, G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*, **13**, 251-76.
- Valencia, X., Stephens, G., Goldbach-Mansky, R., Wilson, M., Shevach, E. M. & Lipsky, P. E. 2006. TNF downmodulates the function of human CD4⁺CD25^{hi} T-regulatory cells. *Blood*, **108**, 253-61.
- van Amelsfort, J. M., Jacobs, K. M., Bijlsma, J. W., Lafeber, F. P. & Taams, L. S. 2004. CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum*, **50**, 2775-85.
- van Santen, H. M., Benoist, C. & Mathis, D. 2004. Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *J Exp Med*, **200**, 1221-30.
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, **24**, 179-89.
- van Eden, W., Holoshitz, J., Nevo, Z., Frenkel, A., Klajman, A. & Cohen, I. R. 1985. Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to Mycobacterium tuberculosis and to cartilage proteoglycans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 5117-20.

- van Zeben, D., Hazes, J. M., Vandenbroucke, J. P., Dijkmans, B. A. & Cats, A. 1990. Diminished incidence of severe rheumatoid arthritis associated with oral contraceptive use. *Arthritis Rheum*, **33**, 1462-5.
- Venables, P. 1988. Epstein-Barr virus infection and autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, **47**, 265-9.
- Vey, E., Burger, D. & Dayer, J. M. 1996. Expression and cleavage of tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors by human monocytic cell lines upon direct contact with stimulated T cells. *Eur J Immunol*, **26**, 2404-9.
- Vignali, D. 2008. How many mechanisms do regulatory T cells need? *Eur J Immunol*, **38**, 908-11.
- Wan, Y. Y. & Flavell, R. A. 2007. Regulatory T cells, transforming growth factor-beta, and immune suppression. *Proc Am Thorac Soc*, **4**, 271-6.
- Wang, Z., Hong, J., Sun, W., Xu, G., Li, N., Chen, X., Liu, A., Xu, L., Sun, B. & Zhang, J. Z. 2006. Role of IFN-gamma in induction of Foxp3 and conversion of CD4+ CD25- T cells to CD4+ Tregs. *J Clin Invest*, **116**, 2434-41.
- Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M. & Murphy, K. M. 2006. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, **24**, 677-88.
- Willenborg, D. O., Fordham, S. A., Staykova, M. A., Ramshaw, I. A. & Cowden, W. B. 1999. IFN-gamma is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide. *J Immunol*, **163**, 5278-86.
- Wong, P. K., Quinn, J. M., Sims, N. A., van Nieuwenhuijze, A., Campbell, I. K. & Wicks, I. P. 2006. Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis Rheum*, **54**, 158-68.
- Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A. D., Stroud, J. C., Bates, D. L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S. F., Mathis, D., Benoist, C., Chen, L. & Rao, A. 2006. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, **126**, 375-87.
- Xiao, S., Jin, H., Korn, T., Liu, S. M., Oukka, M., Lim, B. & Kuchroo, V. K. 2008. Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. *J Immunol*, **181**, 2277-84.
- Xu, L., Kitani, A., Fuss, I. & Strober, W. 2007. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol*, **178**, 6725-9.
- Yamaguchi, Y., Fujio, K., Shoda, H., Okamoto, A., Tsuno, N. H., Takahashi, K. & Yamamoto, K. 2007. IL-17B and IL-17C are associated with TNF-alpha production and contribute to the exacerbation of inflammatory arthritis. *J Immunol*, **179**, 7128-36.

- Yang, J., Murphy, T. L., Ouyang, W. & Murphy, K. M. 1999. Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4⁺ T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation. *Eur J Immunol*, **29**, 548-55.
- Yang, X. O., Pappu, B. P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H. S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A. D., Schluns, K. S., Watowich, S. S., Tian, Q., Jetten, A. M. & Dong, C. 2008. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*, **28**, 29-39.
- Zaiss M. M., Axmann R., Zwerina J., Polzer K., Gückel E., Skapenko A., Schulze-Koops H., Horwood N., Cope A., Schett G. 2007. Treg cells suppress osteoclast formation: a new link between the immune system and bone. *Arthritis Rheum*, **56**, 4104-12
- Zheng, S. G., Wang, J. & Horwitz, D. A. 2008. Cutting edge: Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6. *J Immunol*, **180**, 7112-6.
- Zheng, W. & Flavell, R. A. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, **89**, 587-96.
- Zheng, Y., Josefowicz, S. Z., Kas, A., Chu, T. T., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. 2007. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature*, **445**, 936-40.
- Ziegler, S. F. 2006. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol*, **24**, 209-26.
- Ziff, M. 1989. Pathways of mononuclear cell infiltration in rheumatoid synovitis. *Rheumatol Int*, **9**, 97-103.

7. Anhang

Wissenschaftliche Beiträge

Vorträge

11. German Meeting on Th1/Th2 research, 2008, Marburg

Stirnweiss J., **Eilenstein R.**, Gajda M., Bräuer R.: The role of regulatory T cells and IL-17 in the primary phase and during reactivation of murine antigen-induced arthritis

22nd Winter School on Proteinases and Their Inhibitors, 2005, Tiers, Italy

Schurigt U., **Eilenstein R.**, Gajda M., Stopfel N., Irmeler I., Reinheckel T., Peters C., Bräuer R., Wiederanders B.: Cathepsin L, but not cathepsin B influences the severity of experimental arthritis.

Posterpräsentation

36. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, 2008, Berlin

Eilenstein R., Stirnweiss J., Irmeler I., Gajda M., Bräuer R.: Interaction of IL-17 and interferon- γ during the acute phase of murine antigen-induced arthritis

36. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, 2008, Berlin

Stirnweiss J., **Eilenstein R.**, Frey O., Irmeler I., Gajda M., Bräuer R., The Importance of Regulatory T Cells and the Influence of IL-17 on the Progression of Murine Antigen-Induced Arthritis

6th International Congress on Autoimmunity, 2008, Porto, Portugal

Stirnweiss J., **Eilenstein R.**, Frey O., Irmeler I., Gajda M., Bräuer R., The Importance of Regulatory T Cells and the Influence of IL-17 on the Progression of Murine Antigen-Induced Arthritis

5th General Meeting of the international Proteolysis Society, 2007, Patras, Greece

Schurigt U., Petrow P., Gajda M., **Eilenstein R.**, Stöckigt R. Bräuer R.: Cathepsin B-, L- and K-deficient mice in animal models for rheumatoid arthritis demonstrate the unique role of cathepsin K in joint destruction

34. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, 2006, Wiesbaden

Schurigt U., Rajasekaran N., **Eilenstein R.**, Gajda M., Sevenich L., Reinheckel T., Peters C., Illges H., Bräuer R., Wiederanders B.: Cathepsin L is an important protease in two different models for Rheumatoide Arthritis experimental arthritis
Z Rheumatol, 2006

33. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, 2005, Dresden

Schurigt U., **Eilenstein R.**, Gajda M., Irmner I., Reinheckel T., Peters C., Bräuer R., Wiederanders B.: Cathepsin L, but not cathepsin B influences the severity of experimental arthritis. *Z Rheumatol.* 2005; 64 Suppl 1:101

Danksagung

Diese Promotionsarbeit wurde unter Betreuung von Prof. Dr. Rolf Bräuer im Rahmen einer Förderung durch das Thüringer Ministerium für Wirtschaft, Technologie und Arbeit am Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena in der Arbeitsgruppe Immunpathologie angefertigt.

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei Prof. Dr. Rolf Bräuer für die interessante Themenstellung und die stete Bereitschaft zur Unterstützung bedanken. Allen derzeitigen und ehemaligen Kollegen aus der Arbeitsgruppe, insbesondere Prof. Dr. Rolf Bräuer, Dr. Mięczysław Gajda, Dr. Ingo Irmner, Dipl. Biol. Matthias Ebbinghaus, Dipl. Biol. Steffi Stumpf, Renate Stöckigt, Conny Hüttich, Uta Griechen danke ich für die interessanten Diskussionen, Hilfe in experimentellen und theoretischen Fragen und das gute Arbeitsklima. Die Zeit in der Arbeitsgruppe wird mir in sehr guter Erinnerung bleiben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jörg Stirnweiss für die zahllosen Anregungen und die Hilfe bei der wissenschaftlichen Durchführung meiner Experimente, sowie die Unterstützung während der Doktorandenzeit.

Mein weiterer Dank gilt dem Thüringer Ministerium für Wirtschaft, Technologie und Arbeit sowie Frau Dr. Angela Bernd vom Friedrich-Löffler-Institut in Jena

Ebenso bedanke ich mich bei meinen Eltern Joachim und Marion und meiner Schwester Jana. Sie ermöglichten mir meinen Wertegang und brachten mir die vielen, nicht weniger wichtigen Dinge des Lebens außerhalb der Wissenschaft bei.

Lebenslauf***Persönliche Daten***

Name:	René Eilenstein
Wohnort:	In den Krautgärten 9 99631 Weißensee
Geburtsdatum:	20. März 1975
Geburtsort:	Cottbus
Familienstand:	ledig

Schulbildung

Sept. 1981-Juni 1991	<i>Besuch mit Abschluß an der zehnklassigen Allgemeinen Polytechnischen Oberschule (1988- 1991 Besuch der Kinder- und Jugendsportschule Jena)</i>
----------------------	--

Berufsausbildung

Aug. 1991-Juni 1994	<i>Ausbildung zum Groß- und Außenhandels-kaufmann bei Fa. W. Philippi GmbH/ Illingen (Saarland)</i>
	<i>In dieser Firma war ich bis zum Aug. 1996 kaufmännisch tätig.</i>

Zivildienst

Sept. 1996- Sept. 1997	<i>Krankenpfleger/ Winterbergkliniken Saarbrücken</i>
------------------------	---

Berufsausbildung

Sept. 1997- Juli 1999	<i>Ausbildung zum Biologisch- techn. Assistenten/ Weißenfels</i>
-----------------------	--

Berufstätig

Aug. 1999- Sept. 2000	<i>Paul- Ehrlich Institut/ Langen als Biologisch-techn. Assistenten</i>
-----------------------	---

Hochschulstudium

Okt. 2000- März. 2006	<i>Studium der Biochemie an der Universität Jena</i>
-----------------------	--

Diplomarbeit

Sept. 2004- März 2006

*Am Institut für Pathologie, in der
Abteilung: Immunpathologie*

Thema:

*„Charakterisierung der Antigen-
induzierten Arthritis in Cathepsin B- und
L- defizienten Mäusen“*

Promotionsarbeit

April 2006- März 2009

Am Institut für Pathologie/ Jena

Berufstätig

01.09. 2010

Mitarbeiter in der Firma D.i.a. Solution
GmbH am Helios-Klinikum/ Erfurt

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Bei der Erstellung des Manuskripts und der Auswertung des Materials wurde ich von Prof. Dr. Rolf Bräuer und Dr. Mieczyslaw Gajda unterstützt.

Desweiteren erkläre ich, dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und Dritte im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir erhalten haben.

Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt und die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnlich oder eine andere Abhandlung wurde von mir nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Weißensee, den 15.03. 2010

.....

René Eilenstein

